

Aus der Klinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffkunde
(Direktor: Prof. Dr. M. Kern)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**In-vitro-Untersuchung zur Veränderung proinflammatorischer Genexpression in
humanem Vollblut nach Kontakt mit plasmakonditionierten Implantatoberflächen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
Gesa Becker (geb. Hauschildt)

aus Schleswig

Kiel 2020

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Sönke Harder, Praxis für Zahnmedizin und Implantologie Harder/Mehl

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Christian Graetz, Klinik für Zahnerhaltungskunde und Parodontologie

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2021

Zum Druck genehmigt, Kiel, den 30.11.2020

Gezeichnet: Prof Dr. Franziska Theilig

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsliste	III
1 Einleitung	1
1.1 Dentale Implantate	1
1.1.1 Aufbau	1
1.1.2 Materialien und Oberflächen	2
1.1.3 Indikationen	4
1.2 Osseointegration dentaler Implantate	4
1.2.1 Ablauf des Osseointegrationsprozesses	4
1.2.2 Rolle der Zytokine während des Osseointegrationsprozesses	6
1.3 Plasmakonditionierung	8
1.3.1 Physikalisches Plasma	8
1.3.2 Atmosphärendruck-Plasma	8
1.3.3 Niederdruck-Plasma	9
1.3.4 Alterungsprozesse von Titan in der Atmosphäre	9
1.3.5 Verunreinigungen von Implantatoberflächen	10
1.3.6 Einfluss von Plasmabehandlung auf Titan	10
1.4 Genexpressionsanalyse	11
1.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	11
1.4.2 Kurzbeschreibung von Primern und ihre Funktion	12
1.5 Zielsetzung	13
2 Material und Methoden	14
2.1 Probekörper	14
2.2 Plasmakonditionierung der Testimplantate	15
2.2.1 Konditionierung unter Atmosphärendruck	15
2.2.2 Konditionierung unter Niederdruck	16
2.3 Kontrollgruppe	16
2.4 Verwendete Blutproben	17
2.5 RNA-Extraktion	17
2.6 Bestimmung der optischen Dichte (Konzentrationsbestimmung der RNA)	18
2.7 RNA-Qualitätskontrolle	19

2.8	cDNA-Synthese (reverse Transkription)	19
2.9	Quantitative PCR (qPCR)	20
2.10	Datenanalyse und statistische Auswertung	22
3	Ergebnisse	24
3.1	Bestimmung der RNA-Qualität	24
3.2	Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR	24
3.2.1	Analyse der Genexpression von IL1 β	25
3.2.2	Analyse der Genexpression von TNF α	27
3.2.3	Analyse der Genexpression von NF κ B	29
3.2.4	Analyse der Genexpression von TLR-4	31
3.2.5	Analyse der Genexpression von TLR-9	33
3.2.6	Analyse der Genexpression von FADD	35
3.3	Übersicht der Ergebnisse	36
4	Diskussion	39
4.1	Diskussion der Methodik	39
4.2	Diskussion der Ergebnisse	40
4.2.1	Einfluss der Plasmakonditionierung auf die Expression von IL1 β und TNF α	40
4.2.2	Einfluss der Plasmakonditionierung auf die Oberfläche dentaler Implantate	41
4.3	Schlussfolgerung	44
5	Zusammenfassung	44
6	Summary	46
7	Literaturverzeichnis	48
	Anhang	57
8	Danksagung	57
9	Veröffentlichungen	58
10	Erklärung	58

Abkürzungsliste

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromol
APP	Atmospheric-pressure plasma/Atmosphärendruckplasma
Al	Aluminium
ASTM	American Society for Testing and Materials
B2M	β-2-Mikroglobulin
BPMC	Peripheral Blood Mononuclear Cells
CD	Cluster of Differentiation
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGI	Deutsche Gesellschaft für Implantologie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylenediaminetetraacectic Acid
FADD	Fas-associated-death Domain Protein
G	Gewichtskraft
GHz	Gigahertz
h	Stunde
IL	Interleukin
kHz	Kilohertz
LPP	Low-pressure plasma/Niederdruckplasma

LPS	Lipopolysaccharide
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
ng	Nanogramm
NT-Puffer	Neutralisationspuffer-Titer
p	Signifikanzlevel
Pa	Pascal
PAMPs	Pathogen Associated Molecular Patterns
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
qPCR	quantitative Polymerase-Kettenreaktion
R6K-Puffer	Replication of Plasmid R6K Puffer
s	Sekunden
SDV	Screeptape Disintegration Variable
slm	Selective Laser Melting
SYBR-Green	Cyanin-Farbstoff
TH1-Zelle	Typ-1-T-Helferzelle
TH2-Zelle	Typ-2-T-Helferzelle
TLRs	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumornekrosefaktor
V	Volt
V	Vanadium
W	Watt
ZrO ₂	Zirkoniumdioxid

1 Einleitung

1.1 Dentale Implantate

1.1.1 Aufbau

In der Zahnmedizin versteht man unter einem dentalen Implantat einen schraubenförmigen Körper, welcher in den Kieferknochen eingebracht wird, um darauf Zahnersatz zu befestigen [85]. Dentale Implantate sind in der Regel zweiteilig und beinhalten den im Knochen verankerten Implantatkörper und einen zahnersatztragenden Aufbau (Abutment), die für gewöhnlich miteinander verschraubt werden (Abb. 1) [85].

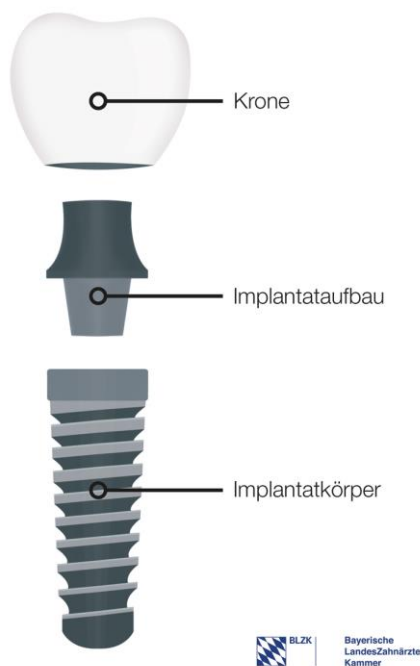


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines dentalen Implantatkörpers mit Aufbau und prothetischer Versorgung (Nutzung der Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Bayerischen Landes Zahnärztekammer)

Anders als in der allgemeinen Chirurgie, bei der Implantate nach ihrer Einheilung allseitig von lebendem Gewebe umgeben werden, durchdringen orale Implantate, bzw. die auf ihnen befestigten Aufbauten (Abutments) die Mundschleimhaut. Dementsprechend handelt es sich bei dentalen Implantaten um sogenannte offene Implantate, die permanent mit der keimbesiedelten Mundhöhle in Verbindung stehen

[85]. Deren Osseointegration ist heutzutage gut vorhersagbar und weist hohe Erfolgsraten von 94,6% Überlebensrate in einem Beobachtungszeitraum von 13,4 Jahren auf [64]. Dennoch kommt es immer wieder zu Implantatverlusten, sei es in der frühen Phase der Osseointegration oder in der späten Phase durch Knochenabbau des periimplantären Knochens [16].

1.1.2 Materialien und Oberflächen

Die Materialien, die für dentale Implantate verwendet werden, müssen mechanisch stabil sein, eine dauerhafte Osseointegration, einen guten Gewebeabschluss und eine gute Biokompatibilität aufweisen [79]. Um eine optimale Gewebeverträglichkeit zu gewährleisten, sollte das Verhalten eines Materials möglichst inert sein, damit keine Freisetzung von Korrosionsprodukten und deren Resorption durch den menschlichen Körper erfolgt. Die Gewebeverträglichkeit wird durch die chemische Zusammensetzung, die Rauigkeit und Topographie der Materialoberfläche und die Oberflächenbenetzbarkeit beeinflusst [79].

Trotz der inzwischen verfügbaren Alternativen der Zirkonoxidimplantate [60] ist Titan noch immer das Standardmaterial für dentale Implantate [16]. Titan findet seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich Einsatz in der Verwendung für dentale Implantate [32] und weist eine hervorragende Biokompatibilität auf [52]. Diese Eigenschaft begründet sich in der hohen Affinität zu Sauerstoff. Hierdurch kommt es zu einer Ausbildung einer Oxidschicht auf der Außenfläche von Titanobjekten. Diese Oxidschicht führt zu einer Passivierung des Metalls und macht es gegenüber reaktionsfreudigen Medien inert [87]. Zudem ist es mechanisch sehr stabil [52]. In der dentalen Implantologie wird Titan als Reintitan oder Titanlegierung verwendet [72]. Die American Society for Testing and Materials (ASTM) gibt an, dass es sechs verschiedene Titanarten gibt, die für dentale Implantate Verwendung finden können. Diese beinhalten vier Grade des Reintitans und zwei Titanlegierungen (Ti6Al14V und Ti6Al4VELi). Durch das Legieren von verschiedenen Metallen, wie Aluminium (Al) und Vanadium (V), entstehen bis zu drei Phasen, in denen die Legierungen vorliegen können (α -, β -, α - β -Phase). Abhängig von der Zusammensetzung und der thermischen Behandlung können mehrere Phasen gleichzeitig vorliegen, wodurch es zu verbesserten physikalischen und mechanischen Eigenschaften, wie geringe Dichte und hohe Resistenz gegenüber Ermüdung und Korrosion, kommen kann [72]. Titan weist ebenfalls ein geringes Elastizitätsmodul auf, welches im Vergleich zu anderen

Implantatmaterialien dem des menschlichen Knochens am ähnlichsten ist. Dies führt zu einer positiven Druckverteilung an der Schnittstelle zwischen Knochen und Implantat [13].

In seltenen Fällen (Prävalenz von 0,6%) werden in der Literatur allergische Reaktionen auf Titan erwähnt [83, 91]. Allerdings wurde ebenfalls dargelegt, dass nach dem Kontakt der Mukosa mit Titan Metallionen aus dem Material freigesetzt werden und durch die Komplexbildung mit nativen Proteinen als Allergen Hypersensitivitätsreaktionen auslösen können [46, 83].

Als Alternative zu den Titanimplantaten werden seit einigen Jahren Keramikimplantate klinisch angewendet. Die meisten Keramiken, die in der Zahnmedizin im Bereich der Prothetik Einsatz finden, sind für den Gebrauch als dentales Implantatmaterial nicht geeignet, da die spröden Eigenschaften der Materialien keine ausreichende Zugfestigkeit gewährleisten [85]. Als Ausnahme erweist sich hier allerdings Zirkoniumdioxid (ZrO_2), welches eine Biegefestigkeit von über 1000 MPa aufweist. Diese guten mechanischen Werte sind in der Umwandlungsverstärkung des ZrO_2 begründet. Bei Raumtemperatur liegt ZrO_2 in einer monoklinen Kristallstruktur vor. Beim Aufheizen kommt es bei 1170 °C zu einer Umwandlung in ein tetragonales Gitter. Hieraus resultiert eine Volumenabnahme. Wird die Keramik wieder abgekühlt, tritt das Gegenteil ein. Werden 3 Mol-% Yttriumoxid (Y_2O_3) hinzugefügt, kommt es zum Unterbinden der Umwandlung von tetragonal zu monoklin, wodurch die tetragonale Struktur auch bei Raumtemperatur stabil ist. Bei übermäßiger mechanischer Belastung kommt es dazu, dass die Phasenumwandlung von tetragonal wieder zu monoklin erfolgt. Hierdurch entsteht eine Volumenzunahme in dem belasteten Bereich, was eine Blockierung des Risses zur Folge hat. Durch diese erhöhte Bruchfestigkeit ist ZrO_2 als Material für dentale Implantate geeignet [85]. Im Vergleich des Knochen-Implantat-Kontaktes der verschiedenen Implantatmaterialien (Titan, ZrO_2) konnten beide Materialien vergleichbare Werte erzielen [49].

Dentale Implantatoberflächen gibt es in verschiedenen Modifikationen. Die Oberflächenmodifikation von dentalen Implantaten wird immer wieder als wichtiger Faktor benannt, der für die Geschwindigkeit der Knochenapposition während der Einheilungsphase eines frisch gesetzten Implantates einflussreich erscheint [85]. Titanoberflächen werden maschinell gefräst und mittels Sandstrahlung, Ätzung oder anodischer Oxidation angeraut, um so eine möglichst gute Osseointegration zu

ermöglichen. Die Sandstrahlung erfolgt mit Korund (Aluminiumoxid, Titanoxid oder Calciumphosphat). Die Osseointegration bei gestrahlten Implantatoberflächen erwies sich erfolgreicher als bei ausschließlich maschinell gefrästen Oberflächen [94]. Die Implantathersteller verwenden zum Teil unterschiedliche Verfahren, um die Implantatoberflächen aufzurauen. Implantate der Firmen Straumann und Camlog werden beispielsweise zunächst gesandstrahlt und anschließend geätzt, um so ein feines Relief zu erzielen [85]. Die Implantate der Firma Nobel Biocare werden mit einer porösen Oxidschicht mit anodischer Oxidation versehen, hierdurch kommt es ebenfalls zu einer Vergrößerung der Implantatoberfläche [85].

1.1.3 Indikationen

Zu den Indikationen dentaler Implantate zählt der Ersatz eines oder mehrerer verlorengegangener bzw. nicht angelegter Zähne und die Verankerung von abnehmbaren Prothesen.

Die Konsensuskonferenz Implantologie hat im Jahr 2014 eine Einteilung der Indikationen in drei Klassen vorgenommen:

- Klasse I: Einzelzahnersatz
- Klasse II: reduzierter Restzahnbestand
- Klasse III: zahnloser Kiefer

Durch ein mittlerweile sehr breites Indikationsspektrum des implantatgetragenen Zahnersatzes nimmt dieser eine immer bedeutendere Rolle ein. Bei Einzelzahnimplantaten beträgt die Überlebensrate nach 5 Jahren 96% und nach 10 Jahren 90%. Dies ist vergleichbar mit den Überlebensraten von konventionellen Brücken auf natürlichen Zähnen, jedoch nicht mit den Überlebensraten der Pfeilerzähne einer konventionellen Brücke [75]. Durch diese Vorteile kommt es zunehmend zu einer Verdrängung des konventionellen Zahnersatzes [85]. Laut Deutscher Gesellschaft für Implantologie (DGI) werden in Deutschland mehr als 1.000.000 Implantate pro Jahr gesetzt.

1.2 Osseointegration dentaler Implantate

1.2.1 Ablauf des Osseointegrationsprozesses

Nach Einbringen des Implantates in den Kieferknochen soll es zu einer Osseointegration kommen, bei der ein funktioneller und struktureller Verbund

zwischen dem Knochen und der Oberfläche des belasteten Implantates entsteht [18, 19]. Dieses geschieht durch einen knöchernen Heilungsprozess, bei dem die Osteoblasten eine feste Anhaftung an die Implantatoberfläche erzeugen. Die Osseointegration eines dentalen Implantates lässt sich in drei Phasen der Stabilität unterteilen:

- Primärstabilität
- Sekundärstabilität
- Tertiärstabilität

In den ersten drei Wochen nach Einbringen eines Implantates handelt es sich um die Primärstabilität. Diese kommt zunächst hauptsächlich durch Verschraubung bzw. mechanische Retention des Implantates im Kieferknochen zustande. In dieser Phase beginnen sich jedoch schon die Osteoblasten an die Implantatoberfläche anzulagern. Während des zunehmenden Verbundes zwischen Implantat und Knochen kommt es zwischenzeitlich zu einer Abnahme der Primärstabilität des Implantates. Dies ist darauf zurückzuführen, dass es Umbauprozesse im Knochen gibt, die eine kurzfristige Abnahme der Stabilität bedingen. Nach etwa vier Wochen kehrt sich das Verhältnis von Retention durch Verschraubung (Friktion) und durch die Anlagerung von Knochengewebe durch die Osteoblasten um. Dies wird als Sekundärstabilität bezeichnet, bei der eine Osseointegration entstanden ist. Die Stabilität des Implantates wird nun hauptsächlich dadurch gewährleistet, dass das Implantat und der Knochen eine feste Verbindung gebildet haben. Die Tertiärstabilität stellt sich etwa zwei bis drei Monate nach Einbringen des Implantates ein. Das Implantat ist so fest im Knochen verankert, dass es funktionell belastet werden kann.

Der biologische Mechanismus, der den Knochen-Implantat-Verbund induziert, ist noch nicht vollständig nachvollzogen. Aber beeinflussende Faktoren sind bekannt. An der epithelialen Anheftung und der knöchernen Einheilung ist die Oxidschicht des Titans maßgeblich beteiligt [29]. Durch Modifizierung der dentalen Implantatoberfläche könnte die Osseointegration gefördert werden. Diese Integration ist unumgänglich, um die Implantate zur Verankerung von prothetischem Zahnersatz nutzen zu können [95]. Die Insertion eines Implantats führt schon zu intensiven Umbauvorgängen (bone remodelling) und Stoffwechselaktivitäten am Implantat-Knochen-Grenzbereich [59]. Schon wenige Sekunden nach Setzen eines dentalen Implantates kommt es zur Ausbildung eines komplexen Biofilms [69]. Dieser setzt sich aus Blutbestandteilen wie

Thrombozyten, Fibrin und Proteasen zusammen. Die Angiogenese geht einer Ansammlung von Osteoblasten aus Knochenmarkstammzellen voraus. Ebenfalls an dem Umbauprozess beteiligt sind aktivierte Mesenchymzellen aus dem angrenzenden Bindegewebe [24].

Dentale Implantate lösen Immunreaktionen in humanem Blut aus [68, 74]. Diese werden durch Mediatoren gesteuert [14, 92]. Auch die physikalische und chemische Beschaffenheit der Implantatoberfläche hat einen Einfluss auf die Reaktion des Immunsystems [31]. Ebenso sind die Zytokinkonzentrationen im Sulkusbereich von Implantaten höher als im Sulkus eines natürlichen Zahnes [67].

Osteoblasten werden durch den chirurgischen Eingriff und das Implantat selbst stimuliert. Infolgedessen schütten aktivierte Mesenchymzellen aus der Implantatumgebung Mediatoren aus, die an der Immunantwort beteiligt sind. Die erste Antwort auf die Implantation ist eine proinflammatorische Reaktion [17], durch die die erste Phase der Osseointegration beginnt. Durch differenzierte Osteoblasten kommt es zu einer Bildung von kollagenhaltiger Matrix [57], die zur Mineralisation beiträgt. Als Interface bezeichnet man die organische Schicht zwischen dem alloplastischen Material des Implantates und der mineralisierten Knochenmatrix [3]. Ein unverkalkter fibrinhaltiger Osteoidsaum bildet sich zwischen Knochen-Implantat-Interface, der durch Mineralisierungsprozesse in Geflechtknochen umgebaut wird, der noch eine unorganisierte Knochenmasse darstellt. Hieran schließt sich ein Umbau in Lamellenknochen an, der durch Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität erfolgt.

1.2.2 Rolle der Zytokine während des Osseointegrationsprozesses

Mit der Hämostase startet der Heilungsprozess und wird bis zum Ende der vollständigen Osseointegration von Interleukinen und anderen Botenstoffen gesteuert [9, 57, 70, 80]. Die Bestimmung der Genexpression von z.B. $\text{TNF}\alpha$, $\text{NF}\kappa\text{B}$ und FADD, die zur Signaltransduktionskaskade gehören, ermöglicht eine Abgrenzung der Proinflammation von einer Apoptose [55].

IL-8 zählt zu den Chemokinen und wird unter anderem von stimulierten Osteoblasten gebildet und ausgeschüttet. Die Stimulation der Osteoblasten erfolgt durch mikroskopisch kleinen Abrieb des Implantatmaterials, ebenso durch $\text{TNF}\alpha$ und $\text{IL}1\beta$. $\text{IL}1\beta$ wiederum wird nach Kontakt mit LPS (Lipopolysacchariden) sezerniert [20]. LPS sind Bestandteil der Zellwand gram-negativer Bakterien. Werden diese im Blut

freigesetzt, werden sie von TLR-4, einem PAMP der Monozyten, erkannt. Dies führt zur Induktion und Freisetzung von TNF α und IL1 β . Durch die Aktivierung der NF κ B-Signalkaskade werden inflammatorische Mediatoren wie zum Beispiel COX-2, Prostaglandine und IL-8 aus den benachbarten Zellen (Endothelialzellen, Osteoblasten, Fibroblasten, Monozyten) freigesetzt. Es werden durch die Induktion von IL-8-Release an der Eintrittsstelle Granulozyten rekrutiert. Hierbei kommt es infolge einer Wechselwirkung zwischen Botenstoff und Hypothalamus zu Fieber. In diesem Prozess werden die anderen Bestandteile des Immunsystems aktiviert. Dies geschieht durch die Produktion von inflammatorischen Mediatoren und Zytokinen und Rekrutierung der Abwehrzellen zum Ort der Entzündung. Die verdauten, prozessierten Antigene werden von den antigenpräsentierenden Zellen zusätzlich den Lymphozyten präsentiert und nach der Erkennung des Antigens wird das spezifische Immunsystem aktiviert. TNF α ist multifaktoriell und kann sowohl inflammatorische Parameter aktivieren als auch die Apoptose induzieren [53, 55]. LPS kann unter anderem die Genexpression aktivieren. TLRs, wie z.B. TLR-4 und bei einigen Menschen TLR-9, erkennen LPS, die dann eine proinflammatorische Immunreaktion hervorrufen [12, 28]. NF κ B, ein Transkriptionsfaktor, wird von TLR-4 und TLR-9 aktiviert [45]. Im Verlauf der Immunreaktion kommt es nach dieser Aktivierung von NF κ B zur vermehrten Produktion von verschiedenen Cytokinen, zu denen u.a. IL1 β gehört [23, 47].

Durch den Kontakt des Implantates mit dem menschlichen Gewebe kommt es unweigerlich zu einer Entzündungsreaktion. Typisch für diesen Entzündungsprozess ist die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen, zu denen IL1 β und TNF α gehören [14, 92]. IL1 β ist ein Hauptakteur der Entzündungsreaktion und besonders in den Heilungsprozess involviert, da es die Ausschüttung von weiteren Zytokinen und Wachstumsfaktoren initiiert [22, 25]. Chronische und aggressiv voranschreitende Entzündungen zählen zu Hochrisikofaktoren, die in Verbindung mit Implantatverlusten durch Verhinderung der Osseointegration gebracht werden [95]. Die Expression von TNF α in der frühen und mittleren Phase der Osseointegration hat vermutlich einen direkten Einfluss auf den Einheilungserfolg eines Implantates. Kommt es zu einem Anstieg innerhalb dieser Phase der Einheilung, besteht vermutlich eine Beziehung zu späteren Einheilungskomplikationen [84]. Ebenso wurde eine Beteiligung von IL1 β bei späten Implantatverlusten [48, 54, 63, 89] und Periimplantitis mit periimplantärem Knochenabbau festgestellt [51, 81, 82].

1.3 Plasmakonditionierung

1.3.1 Physikalisches Plasma

Als physikalisches Plasma bezeichnet man nach fest, flüssig und gasförmig den vierten Aggregatzustand. Unter Zuführung ausreichender Energie entsteht ein Plasma. Dies ist ein Zustand, in dem sich die äußeren Elektronen der Gasatome bzw. -moleküle ablösen. Durch die freie Bewegung der Atome, Moleküle, Ionen und Elektronen kommt es zu einer Wechselwirkung untereinander. Dementsprechend handelt es sich bei einem Plasma um ein ionisiertes Gas (vollständig oder nur teilweise), das als Medium, welches elektrisch leitend ist, eine Vielzahl von besonderen Eigenschaften besitzt [33]. Diese Eigenschaften werden mittlerweile auch in verschiedenen anderen Gebieten der Medizin genutzt. In der Dermatologie wird die Plasmakonditionierung, zum Beispiel zur Therapie der Psoriasis, bereits klinisch angewendet. Im chirurgischen Bereich wird die Plasmakonditionierung für die Gewebetrennung, die Gefäßverödung und zur Reinigung von Oberflächen eingesetzt [30].

1.3.2 Atmosphärendruck-Plasma

Unter Atmosphärendruck-Plasma (APP) versteht man den Sonderfall eines Plasmas, bei dem der Druck dem umgebenden Atmosphärendruck entspricht. Dementsprechend ist ein Reaktionsgefäß, welches den speziellen Druck des jeweiligen Plasmas aufrechterhält, bei der Nutzung des APP nicht notwendig.

Es gibt drei Verfahren zur Herstellung des APPs:

- Coronaentladung
- Barrierenentladung
- Plasma Jet

Das APP wird mit einer Plasmadüse erzeugt. In dieser wird durch Hochspannungsentladung (5-15 kV, 10-100 kHz) ein gepulster Lichtbogen hergestellt. An dieser Entladungsstrecke strömt das Prozessgas vorbei und wird angeregt, wodurch es in den Plasmazustand überführt wird. Über einen Düsenkopf wird das Plasma auf die Oberfläche des zu behandelnden Materials geleitet [85, 93].

1.3.3 Niederdruck-Plasma

Unter Niederdruck-Plasma (LPP) versteht man ein Plasma, in dem der Druck deutlich unterhalb des Atmosphärendruckes liegt. Um den Niederdruck aufrechterhalten zu können, ist ein Reaktionsgefäß bzw. eine -kammer notwendig. Für gewöhnlich liegt der Druck eines LPPs bei wenigen Pascal, was um den Faktor 10.000 niedriger ist als der Atmosphärendruck.

Bei der Plasmakonditionierung mit Niederdruck wird in einer Kammer über einen Gasabzug die Atmosphäre evakuiert und über eine Gaszufuhr ein Prozessgas eingeführt. In dieser Studie war das Prozessgas Argon. Anschließend wird das Plasma gezündet. Das Prinzip beruht darauf, dass, wenn zwei Stoffe eine Ladungsdifferenz besitzen, ein elektronisch messbares Feld zwischen ihnen entsteht. Ist die angelegte Spannung groß genug, um den Widerstand zwischen den zwei Stoffen zu überwinden, kommt es zum Ladungsaustausch. In dem Hochfrequenz-Spannungsgenerator wird dadurch zwar ein elektronisches Feld erzeugt, dieses befindet sich aber im unteren Frequenzbereich (GHz). Hierdurch kann keine ultraviolette Strahlung emittiert werden. Durch das Abstrahlen aufeinandertreffender Teilchen tritt diese jedoch diffus auf. Die UV-Strahlung ist wichtig für das Aufbrechen langkettiger Kohlenstoffverbindungen und für die Bildung von Radikalen.

1.3.4 Alterungsprozesse von Titan in der Atmosphäre

Eine zeitliche und für gewöhnlich unerwünschte Veränderung von Materialeigenschaften wird als Alterung bezeichnet. Es kommt in Folge eines Alterungsprozesses zum Beispiel zu einer Versprödung oder Erweichung. Dieser Prozess kann durch wechselnde mechanische Belastungen, wechselnde Temperaturen, UV-Strahlung, ionisierende Strahlung oder ein korrosives Medium verursacht werden.

Beim Kontakt von Titan mit der Atmosphäre kommt es zu einer Anlagerung von Kohlenwasserstoff. Diese wirkt sich negativ auf die Osteoklastenaktivität aus, was wiederum eine gestörte Osseointegration zur Folge hat. Diese Anlagerung an Titanimplantate ist unabhängig von der Oberflächenbeschaffenheit (maschinell gefräst, gesandstrahlt, geätzt) [38].

1.3.5 Verunreinigungen von Implantatoberflächen

Trotz der sterilen Verpackung, in der die dentalen Implantate von den Herstellern geliefert werden, und genauer Qualitätsprüfungen kann es zu Verunreinigungen der Implantate kommen, die beispielsweise ähnliche Immunreaktionen hervorrufen, wie sie LPS induziert [37].

Hierbei handelt es sich aber nicht zwangsläufig immer um Verunreinigungen organischer Natur, sondern auch um Partikel, die im Herstellungsprozess der Implantate anfallen. So gibt es nachweislich Auflagerungen von Partikeln der Größe 0,5-10 µm auf steril verpackten Implantaten [27]. Lösen sich diese Partikel, so sammeln sie sich an der Insertionsstelle des Implantates im kortikalen Knochen des Patienten an und es kann zu Fremdkörperreaktionen kommen [4]. Infolgedessen kommt es zu einer vermehrten Osteoklastenaktivität, welche eine frühe Osseointegration behindert [90].

1.3.6 Einfluss von Plasmabehandlung auf Titan

Bei der Plasmakonditionierung handelt es sich um ein Verfahren, bei dem die Eigenschaften einer Oberfläche verändert werden. Die Behandlung mittels Plasmakonditionierung bietet die Möglichkeit, Oberflächen zu reinigen und zu desinfizieren.

Durch die Behandlung dentaler Titanimplantate können Mikroorganismen, die durch Verunreinigungen im Herstellungsprozess die Implantate besiedelt haben könnten, abgetötet werden. Dies entspricht der Wirkung einer Desinfektion [93]. Zudem besteht die Möglichkeit, die Implantate von Verunreinigungen durch Partikel, die im Herstellungsprozess entstehen und sich auf die Implantatoberfläche anlagern können, zu befreien.

Ebenfalls kann durch die Plasmakonditionierung dentaler Titanimplantate direkt vor der Insertion die Kohlenstoffanlagerung auf die Implantatoberfläche entfernt werden. Hierdurch können die Alterung des Titans in der Atmosphäre reduziert und die ursprünglichen positiven Oberflächeneigenschaften in Bezug auf die Osseointegration wiederhergestellt werden [65].

Die Implantatoberfläche ist ohne Passivierungsschicht deutlich hydrophiler, wodurch eine Anlagerung von Wasser, Proteinen und Zellen erleichtert wird. Die

Plasmakonditionierung verursacht keine morphologischen Veränderungen der Implantatoberfläche [15].

Noch sind nicht alle Signalkaskaden vollständig nachvollzogen, die die Optimierung und die positive Modulation der zellulären Effekte beeinflussen.

1.4 Genexpressionsanalyse

1.4.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR, die von Mullis 1984 beschrieben wurde, ist zur quantitativen PCR (qPCR) weiterentwickelt worden. Bei diesem Verfahren ist es möglich, eine Vervielfältigung spezifischer Ausgangs-DNA zu erzielen. Dies geschieht durch Denaturierung der Doppelstrang-DNA und anschließende Amplifikation mithilfe von sequenzspezifischen Primern in Gegenwart einer hitzestabilen Polymerase.

Die PCR beinhaltet drei Schritte, die sich wiederholen, und beginnt mit einer Denaturierung der DNA bei etwa 95°C. Anschließend wird primerabhängig eine Abkühlung vorgenommen, bis die sogenannte Annealingtemperatur erreicht wird. Bei dieser Temperatur lagert sich der Primer an einer bestimmten Nukleotidsequenz des Einzelstranges an. Als letzter Schritt folgt die Extension an den Primern mit der Polymerase bei 72°C. Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs: dA(adenosin), dG(guanin), dC(cytosin), dT(thymin)), die im Reaktionsgemisch enthalten sind, werden von der Polymerase komplementär an den Ausgangsstrang angelagert. Aus dieser Kopie entstehen nach (n) Zyklen im Idealfall (n) Verlängerungsprodukte, die dann wiederum exponentiell viele Endprodukte ergeben [41].

Bei qPCR, die angewendet wurde, wird ergänzend ein Cyanin-Farbstoff (SYBR-Green) hinzugefügt. Dieser bildet einen DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex, indem er sich an die Doppelstrang-DNA anlagert. Dieser Komplex absorbiert blaues Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{max}}=494\text{nm}$ und emittiert grünes Licht der Wellenlänge $\lambda_{\text{max}}=521\text{nm}$. Dies ermöglicht eine foto-optische Messung und dementsprechend eine Quantifizierung der mit SYBR-Green beladenen Endprodukte, die sich jedem Ende der Elongationsphase anschließen.

Nach der abgeschlossenen PCR erfolgt die Schmelzkurvenanalyse des entstandenen Endproduktes. Unter stetiger Temperaturerhöhung wird hierbei die Fluoreszenz des

DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplexes gemessen und herausgefunden, wann es zu einer Denaturierung der Doppelstrang-DNA und einem Auflösen des Komplexes kommt.

Hierdurch ist es möglich, die Qualität des Endproduktes zu ermitteln. Irrtümlich entstandene Primer-Dimere oder andere falsche Endprodukte, wie etwa unspezifische PCR-Produkte, würden zu mehreren Adsorptionsmaxima führen, da sie unterschiedliche Schmelztemperaturen aufweisen würden [77].

1.4.2 Kurzbeschreibung von Primern und ihre Funktion

Bei Primern handelt es sich um DNA-Oligonukleotide, die eine Länge von 18-24 Nukleotiden aufweisen, als Startsequenz der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) fungieren sollten [45] und keine Sekundärstrukturen oder Homodimere bilden. Optimalerweise ist das Verhältnis von Adenin/Thymin zu Guanin/Cytosin ausgeglichen. Ebenso sollten sich am 3' Ende zwei, besser drei Guanin- oder Cytosin-Basen befinden.

Unter Zuhilfenahme der Wallis-Regel lässt sich unter Berücksichtigung der Primer-Zusammensetzung die Schmelztemperatur berechnen [97]. Hierbei wird für jedes Guanin/Cytosin-Basenpaar 4 und jedes Adenin/Thymin-Basenpaar 2 addiert. Grundlage dieser Berechnung ist die unterschiedliche Enthalpie, die durch die Anzahl der Wasserstoff-Brücken und den Einfluss der Van-der-Waals-Wechselwirkung der unterschiedlichen Basenpaare zustande kommt. Von der Summe wird 5 subtrahiert, wodurch eine erste Näherung der Anlagerungstemperatur (Annealingtemperatur) in Grad Celsius entsteht. Die Annealingtemperatur liegt kurz unterhalb der Schmelztemperatur. Die Annealingtemperatur wird nahe der theoretischen Annealingtemperatur gewählt, um eine möglichst hohe Spezifität der hergestellten Endprodukte zu erzielen. In der Regel ist die Spezifität 3°C unter der errechneten Annealingtemperatur ausreichend. Beim Überschreiten der Annealingtemperatur erfolgt keine Primeranlagerung an den DNA-Strang. Dementsprechend kann keine erfolgreiche PCR ablaufen [73, 79]. Wird die Annealingtemperatur nicht erreicht, kommt es nur zu einer unspezifischen und unvollständigen Anlagerung der Primer an die einzelsträngige DNA. So entstehen bei der Polymerase unterschiedliche Produkte, welche durch die abschließende Schmelzkurvenanalyse bestimmt werden können. Dies ist möglich, da dann mehrere Schmelzmaxima auftreten.

Die Herstellerfirmen von Primern verfügen über firmeninterne Algorithmen zur Errechnung der Annealingtemperatur, die auf den Grundlagen der oben beschriebenen Methoden beruhen. Diese Herstellerangaben finden für gewöhnlich im Laboralltag Verwendung.

1.5 Zielsetzung

Zielsetzung dieser Arbeit war es, den Einfluss der Plasmakonditionierung dentaler Titanimplantate mittels LPP und APP auf die proinflammatorische Genexpression zu untersuchen.

Es ist bereits bekannt, dass es durch die Nutzung von Plasmakonditionierung zu mehreren positiven Effekten kommt. So besteht die Möglichkeit, mittels Plasmakonditionierung Oberflächen zu reinigen, zu desinfizieren und zu sterilisieren. Zudem kann die Oberflächeneigenschaft des Titans positiv beeinflusst werden, indem es beispielsweise hydrophiler wird.

In dieser Studie sollte der Fokus ganz besonders auf die positive Beeinflussung der proinflammatorischen Genexpression in Bezug auf die frühe Osseointegration eines dentalen Titanimplantates im Kieferknochen gesetzt werden. Dies sollte über die gezielte Modulation der proinflammatorischen Genexpression mittels Plasmakonditionierung untersucht werden. Hierzu wurden die Expression von IL1 β und TNF α bestimmt, die Aussagen darüber ermöglichen, ob eine Entzündungsreaktion positiv oder gar negativ beeinflusst wird. Die Bestimmung der Genexpression der Zytokine NF κ B, FADD, TLR-4 und TLR-9 diente dazu, Verunreinigungen zu erkennen.

Zielsetzung war es, nachzuweisen, ob durch eine Plasmakonditionierung dentaler Titanimplantate mittels APP und LPP eine positive Beeinflussung der Osseointegration erzielt werden kann.

2 Material und Methoden

2.1 Probekörper

Bei den Testimplantaten handelte es sich um 30 dentale Titanimplantate mit gestrahlt-geätzten Oberflächen (Camlog SCREW-LINE Implantat, Promote plus, Länge 9 mm, Durchmesser 4,3 mm, Camlog Biotechnologies Basel, Schweiz) (Abb. 2).



Abbildung 2: Dentale Titanimplantate der Firma Camlog (SCREW-LINE Implantat, Promote plus) in einer Aufnahmevorrichtung zur Plasmakonditionierung

Die vom Hersteller steril verpackten dentalen Implantate wurden aus der Blisterpackung mithilfe eines zum Implantatsystem gehörenden, sterilisierten Aufnahmeinstrumentes entnommen und von der ursprünglichen Kunststoffeinbringhilfe getrennt. Die Einbringhilfe wurde für den Versuchsablauf nicht weiter benötigt und entsorgt. Ohne Berührung der Implantatoberfläche wurden die Implantate in die jeweiligen Aufnahmevorrichtungen der Konditionierungskammer eingebracht. Die Aufnahmeeinrichtung wurde zuvor mittels 99%igem Isopropanol entfettet und diente dazu, die Implantate bei der Konditionierung in der gewünschten Position zu fixieren.

2.2 Plasmakonditionierung der Testimplantate

2.2.1 Konditionierung unter Atmosphärendruck

Für die Konditionierung unter Atmosphärendruck wurde ein Plasma Jet (FG 5001, Fa. PlasmaTreat GmbH, Steinhagen, Deutschland) verwendet (Abb. 3). Folgende Parameter wurden eingestellt:

- Spannung 300 V
- Frequenz 19 kHz
- Gasfluss 30 slm (Stickstoff)
- PCT 100%
- Leistung 800 W
- Konditionierungsdauer: 1 min

Der Abstand zwischen der Düse des Plasma Jet und den Implantatkörpern betrug 4 mm. Die Geschwindigkeit des Gasstroms betrug 4 mm/s. Der Plasma Jet bewegte sich mit einer Geschwindigkeit von 5 m/min über die Implantatkörper. Nach Abschluss der Konditionierung wurden die Implantate mit einer sterilen Pinzette aufgenommen und von der mit dem Implantat verschraubten Einbringhilfe getrennt. Auch diese Einbringhilfe fand keine weitere Verwendung. Es wurden jeweils 5 Implantate gleichzeitig konditioniert, so dass für 10 Proben der Gruppe 2 Konditionierungsdurchgänge notwendig waren.

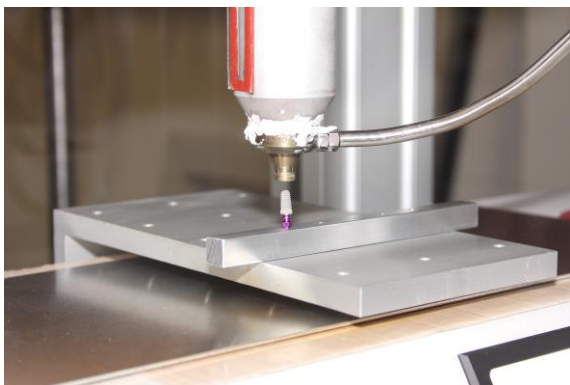


Abbildung 3: Plasmakonditionierung eines dentalen Implantates mittels Plasma Jet unter Atmosphärendruck

2.2.2 Konditionierung unter Niederdruck

Zehn Implantate bildeten die Testgruppe für die Konditionierung mittels Niederdruck-Plasma. Für die Konditionierung unter Niederdruck wurde eine Plasmaanlage (Femto PCCE Zahntechnik, Diener electronics GmbH & Co. KG, Ebhausen, Deutschland) mit folgenden Parametern verwendet (Abb. 4):

- Argon-Gas Sättigung 100 %
- Leistung 200 W
- Druck: 50 Pa
- Konditionierungsdauer: 15 min

Es wurden alle 10 Implantate gleichzeitig konditioniert, so dass nur ein Durchgang notwendig war. Nach Abschluss der Konditionierung wurden die Implantate mit einer sterilen Pinzette aufgenommen und von der mit dem Implantat verschraubten Einbringhilfe getrennt. Auch diese Einbringhilfe fand keine weitere Verwendung.

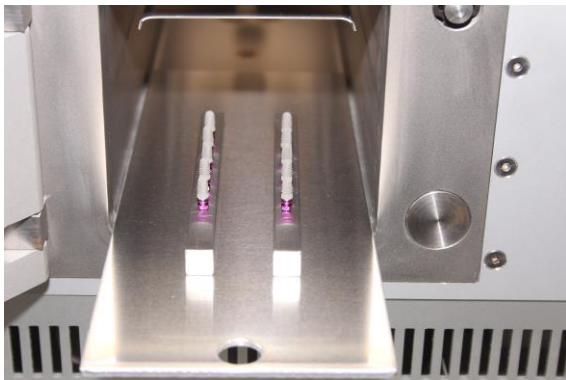


Abbildung 4: Zehn Testimplantate in der Aufnahme der Plasmaanlage zur Konditionierung unter Niederdruck

2.3 Kontrollgruppe

Als Kontrollgruppe dienten 10 baugleiche Implantate, die direkt aus der Umverpackung entnommen wurden und ohne weitere Konditionierung direkt zur Inkubation in die Blutproben weiterverwendet wurden.

2.4 Verwendete Blutproben

Einem 39 Jahre alten, gesunden, männlichen, kaukasischen Spender wurden mittels einer Venenpunktion 65 ml Blut mit einem Butterfly BD Valu-Set über einen Multiadapter (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) entnommen und in EDTA-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt.

Je 2 ml EDTA-Blut wurden in 30 15 ml pyrogenfreie Falcon Reaktionsgefäße (Becton Dickinson, Meylan, Frankreich) pipettiert. In diese Gefäße wurden die 10 bei Niederdruck plasmakonditionierten Implantate, die 10 bei atmosphärischem Druck plasmakonditionierten Implantate und die 10 nichtplasmakonditionierten Kontrollimplantate mit einer sterilisierten Pinzette eingebracht. Es wurde darauf geachtet, dass die Implantate komplett von dem humanen Vollblut bedeckt waren.

Die Reaktionsgefäße wurden sofort verschlossen und in einem Water-Jacketed-Incubator (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) bei 37 °C und einer 5%igen CO₂-Sättigung auf einem Mini-Traumel-Wipptisch (WT 17, Biometra, Göttingen, Deutschland) mit 50 U/min inkubiert. Der Wipptisch war nötig, um eine Phasentrennung des humanen Vollbluts in Serum und zelluläre Bestandteile zu verhindern.

Nach 1, 8 und 24 Stunden wurden je 200 µl Blut aus jedem Reaktionsgefäß bei Raumtemperatur entnommen, mit 800 µl PRIsure (Promolgene, Berlin, Deutschland) vermischt und bei -80°C bis zur weiteren RNA-Extraktion (siehe Kapitel 2.2) eingefroren.

Das verbleibende Blut wurde zwischen den Probenentnahmen, wie oben beschrieben, weiter inkubiert.

2.5 RNA-Extraktion

Für die RNA-Extraktion wurden die Blut/PRIsure-Proben bei Raumtemperatur aufgetaut.

Zu den Proben wurden je 200 µl Chloroform hinzugegeben. Hiernach erfolgte eine Durchmischung für 1 min und eine Ruhezeit von 1 min. Anschließend wurde das Gemisch zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417 R; Eppendorf, Hamburg, Deutschland, 4°C, 12000 g/min, 15 min).

Der wässrige Überstand von 450 µl wurde abpipettiert, mit 600 µl 99%igem Isopropanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Hiernach wurde 1 µl Glycogen (1 mg/ml) hinzugefügt und das Gemisch über Nacht bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Am Tag darauf wurden die Proben erneut zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417 R; 4°C, 12000 g/min, 10 min) und der Überstand verworfen. Zu den verbliebenen Präzipitaten wurden 1000 µl 75%iges Ethanol hinzugegeben, um das Präzipitat zu waschen. Hierzu wurde es aufgeschüttelt (Vortex Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz), zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417 R, 4°C, 7500 g/min, 5 min) und das Ethanol verworfen. Dieser Vorgang des Waschens wurde noch einmal wiederholt. Anschließend wurden die geöffneten Reaktionsgefäße für 15 min unter einen Abzug zum Trocknen gestellt.

Das gewonnene Präzipitat wurde mit 20 µl Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser (Promologene, Berlin, Deutschland) gelöst und für 2 min in einem Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 70°C inkubiert, um sicherzugehen, dass sich die RNA löst.

Im Anschluss daran wurden die Proben sofort auf Eis gegeben und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.6 Bestimmung der optischen Dichte (Konzentrationsbestimmung der RNA)

Zur Bestimmung der optischen Dichte wurde ein Spektrophotometer (Nano-Drop 1000, Peq-Lab, Erlangen, Deutschland) benutzt. Der RNA-Gehalt wurde mittels Absorptionsspektrometrie ermittelt. Dieses Verfahren beruht auf dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren bei 260 nm.

Zunächst wurde die Elektrode mit DEPC-Wasser gereinigt und geeicht. Nach dieser Kalibrierung wurden zur Bestimmung der Dichte 2 µl jeder Probe gemessen. An jede Probenmessung schlossen sich eine erneute Reinigung, Kalibrierung mittels DEPC-Wasser und Trocknung der Elektrode an, um eine Verunreinigung durch eine vorangegangene Messung zu vermeiden.

Eine RNA-Lösung mit einer Konzentration von 40ng/µl besitzt einen Absorptionswert von 1.

2.7 RNA-Qualitätskontrolle

Zur Bestimmung der RNA-Qualität wurden von jeder Probe 2 µl RNA (100 ng/µl) mit je 2 µl R6K-Puffer (PeqLab) gemischt, zentrifugiert und für 3 min bei 72°C inkubiert. Die Proben wurden sofort auf Eis gelagert. Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte anschließend vollautomatisch in der Tapestation-Elektrophorese (Lab 901, PeqLab). Die integrierte Software (Screentape Software, PeqLab) berechnete die RNA-Qualität. Hierbei wurde die Relation der 28S und 18S RNA als Grundlage genutzt, wobei fragmentierte RNA-Anteile berücksichtigt wurden.

Die Software berechnete nach Abschluss der Elektrophorese die Screentape Disintegration Variable (SDV).

Laut Hersteller können Werte der SDV folgendermaßen eingestuft werden:

- SDV-Werte unterhalb von 10 deuten auf RNA von guter bis sehr guter Qualität hin.
- SDV-Werte von 10-25 deuten auf eine akzeptable RNA-Qualität hin.
- SDV-Werte von über 25 deuten auf eine inakzeptable RNA-Qualität hin.

2.8 cDNA-Synthese (reverse Transkription)

Nach Herstellerangaben wurde die cDNA-Synthese mithilfe des ExpressArtTR-cDNA-synthesis-kit der Firma Amptec (Amptec, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die isolierte RNA diente als Ausgangsmaterial.

In einem ersten Schritt wurden pro Probe dreimal 0,2 µg RNA und 1 µl Oligo dT 12 V Primer (10µM) miteinander vermischt und mit DEPC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 12 µl aufgefüllt. Die Hybridisierung dieses Primers erfolgte am poly-a-Ende aller in der Probe vorhandenen mRNAs. Um die Primeranlagerung zu ermöglichen, wurden die Proben 5 min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort auf Eis gelagert.

Im zweiten Schritt wurde für die reverse Transkription ein Mastermix aus 1µl dNTPs (jeweils 2,5 mM), 4 µl Reaktionspuffer, 0,25 µl Reversetranskriptase (200 u/µl) und 2,75 µl DEPC-Wasser hergestellt (cDNA-Synthesekit, Promolgene, Berlin, Deutschland). Zu je 8 µl des Mastermixes wurden 12 µl der Primeranlagerungsreaktion hinzugefügt und vermischt. In einem Thermoblock (Thermocycler, Biometra, Göttingen, Deutschland) erfolgte die Inkubation für 60 min bei 45°C und anschließend für 10 min bei 72°C. Im Anschluss daran wurden die Proben erneut auf Eis gelagert.

Die erstellten Triplets pro Probe wurden nun zusammengefügt und mithilfe des PCR-Extrakt-II-Kits (Macherey&Nagel, Düren, Deutschland) von überschüssigen dNTPs und Primern gereinigt. Hierfür wurde jede Probe mit je 240 µl NT-Puffer gemischt, auf eine Säule pipettiert und 1 min bei 11000 g/min für 1 min zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen.

Hiernach wurden jeweils 600 µl NT3-Puffer auf die Säule pipettiert, abermals bei 11000 g/min für 1 min zentrifugiert und das Eluat verworfen. Zur Reduktion der Restfeuchtigkeit erfolgten anschließend eine Zentrifugation bei 11000 g/min für 2 min und die Inkubation der geöffneten Säulen bei 70°C in einem Thermomixer (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Anschließend wurden die Säulen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gestellt (Saarstedt-Nürmbrecht).

Auf jede Säule wurden 60 µl NE-Puffer pipettiert, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min bei 11000 g/min zentrifugiert. Die Proben wurden dann mit NE-Puffer auf ein Gesamtvolumen von 150 µl aufgefüllt und in 50 µl Aliquots bei -20°C bis zur weiteren Analyse gelagert.

2.9 Quantitative PCR (qPCR)

Der PCR-Mastermix enthält die Taq-Polymerase (*Thermophilus aquaticus*) und alle 4 Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs: dA(adenosin), dG(guanin), dC(cytosin) und dT(thymidin)). Pro Reaktion wurden 2,5 µl cDNA (entspricht 10 ng totaler RNA) mit einem Mastermix aus 12,5 µl 2xHotStartMix (Promolgene, Berlin, Deutschland), 1,0 µl Primer-Mix (Promolgene, Berlin, Deutschland), 0,5 µl SYBR-Green (Promolgene, Berlin, Deutschland), 8,5 µl DEPC-Wasser (Promolgene, Berlin, Deutschland) vermischt und folgendermaßen inkubiert:

- initiale Denaturierung 10 min bei 95°C
- 40 Zyklen: Denaturierung 20 s bei 95°C, Primeranlagerung 20 s (Temperaturen siehe Tab.1), Elongation 20 s bei 72°C.

Nach jedem Zyklus wurde im Anschluss an die Elongationsphase eine Datengenerierung erhoben. Im Anschluss an den letzten Zyklus erfolgte die Schmelzkurvenanalyse.

Es wurden die Expressionslevel der Gene β -2-Mikroglobulin (B2M), 18 s RNA, β -actin (Housekeeping-Gene als Kontrolle), TLR-4, TLR-9, NF κ B, IL1 β , TNF α und FADD bestimmt.

Tabelle 1: Darstellung der untersuchten Gene, ihre Funktion und die in der PCR verwendeten Annealingtemperaturen.

Da es sich bei den Primern um kommerziell erhältliche Primermixe handelt, ist eine Angabe der Primersequenzen nicht möglich.

Gen	Funktion	Annealingtemperatur
Haushaltsgene	Dienen als Kontrollgene, da sie unabhängig von äußeren Einflüssen konstant exprimiert werden und nicht regulierbar sind. Es werden die Gene β -actin, β -2-mikroglobulin und 18S-RNA untersucht.	
Interleukine	Dienen als Botenstoff zwischen Makrophagen und Leukozyten.	
IL1 β	Stimulieren die Produktion u.a. durch LPS oder andere endogene Pyrogene, Produktion in Monozyten und Makrophagen.	62°C
TLR	Erkennen Transmembrane Proteine von pathogen associated molecular patterns (PAMPs), induzieren die Produktion von Cytokinen und Chemokinen nach der Stimulation durch PAMPs.	
TLR-4	Erkennt LPS, einen Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien, wichtig bei der angeborenen Immunität.	61°C
TLR-9	Erkennt CpG-Sequenzen aus Bakterien und Viren, Interaktion mit LPS möglich.	60 °C
TNF α	Anregung von Apoptose, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Ausschüttung	60 °C

	anderer Zytokine möglich, Ausschüttung durch Makrophagen, Stimulation durch LPS.	
NFκB	Verstärken die Transkription der Immunzellen, Aktivierung z.B. durch Signaltransduktionskaskaden durch TNFα oder TLRs.	58°C
FADD	Adaptermolekül, Interaktion mit verschiedenen Zelloberflächenrezeptoren und Mediatoren der Apoptose (z.B. TNFα).	60°C

2.10 Datenanalyse und statistische Auswertung

Die Ergebnisse der RT-qPCR wurden mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode statistisch ausgewertet. Zur relativen Quantifizierung wurden die Werte der 3 Haushaltsgene β -actin, 18S RNA und β -2 microglobulin herangezogen.

Als 1 auf der y-Achse wurden die ΔC_T -Werte der Kontrollimplantate zum Zeitpunkt 0 festgelegt und die zeitlich darauffolgenden „fold change“-Werte mithilfe folgender Gleichung bestimmt:

1. Bei verminderter Genexpression:
 $(1/2^{\Delta C_T \text{ zum Zeitpunkt 0}}) - (\Delta C_T \text{ zum Inkubationszeitpunkt})$
2. Bei zunehmender Genexpression:
 $(2^{\Delta C_T \text{ zum Zeitpunkt 0}}) - (\Delta C_T \text{ zum Inkubationszeitpunkt})$

Ebenfalls wurden die ΔC_T -Werte der inkubierten Blutproben mit den Kontrollimplantaten, die zu den anderen Zeitpunkten gemessen wurden, auf der y-Achse als 1 festgelegt und die zeitlich darauffolgenden „fold change“-Werte mithilfe folgender Gleichung bestimmt:

1. Bei sinkender Genexpression:
 $(1/2^{\Delta C_T \text{ der Kontrollimplantate}}) - (\Delta C_T \text{ der Testimplantate})$
2. Bei steigender Genexpression:
 $(2^{\Delta C_T \text{ der Kontrollimplantate}}) - (\Delta C_T \text{ der Testimplantate})$

Die C_t -Werte der Kontrollgruppe wurden zum Zeitpunkt 1, 8 und 24 Stunden als Referenzwert festgelegt, um den Effekt der Plasmakonditionierung isoliert betrachten zu können.

Die gesammelten Daten wurden als Standardabweichung der „fold change“-Werte dargestellt und mithilfe der SPSS 22.0 Software (IBM Corp., Armonk, NY, USA) ausgewertet. Als erstes wurden die Daten durch den Kolmogorov/Smirnov-Test positiv auf eine Normalverteilung getestet. Hiernach wurden einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-post-hoc-Test durchgeführt. P-Werte von 0,05 oder kleiner wurden als signifikant betrachtet.

3 Ergebnisse

Im Folgenden wird die Expression der Gene IL1 β , TNF α , NF κ B, FADD, TLR-4 und TLR-9 jeweils auf einer Seite mit mehreren Grafiken dargestellt. Die erste Grafik zeigt zunächst die Expression des jeweiligen Gens in der Gruppe der Kontrollimplantate. Anschließend folgt die Darstellung der Genexpression nach der Plasmakonditionierung der Implantate unter Atmosphärendruck (atmospheric-pressure plasma, APP). Hiernach wird der Verlauf der Genexpression der unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantate in Relation zu den Kontrollimplantaten untersucht (Kontrolle/Test APP). Im Folgenden wird die Genexpression nach der Plasmakonditionierung der Implantate unter Niederdruck (low-pressure plasma LPP) betrachtet. Abschließend folgt auch hier die Darstellung des Verlaufes der Genexpression der unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantate in Relation zu den Kontrollimplantaten (Kontrolle/Test LPP).

3.1 Bestimmung der RNA-Qualität

Die SDV-Werte der RNA lagen im Bereich unterhalb von 10. Dies deutet auf RNA von guter bis sehr guter Qualität hin.

3.2 Genexpressionsanalyse mittels RT-qPCR

Die Genexpressionslevel der Gene IL1 β , TNF α , NF κ B, FADD, TLR-4 und TLR-9 wurden mittels RT-qPCR nachgewiesen.

Dieses Verfahren wird zur Quantifizierung eines spezifischen Gens genutzt und beruht auf dem Prinzip der PCR.

3.2.1 Analyse der Genexpression von IL1 β

In Abbildung 5 ist die IL1 β -Genexpression in humanem Vollblut dargestellt.

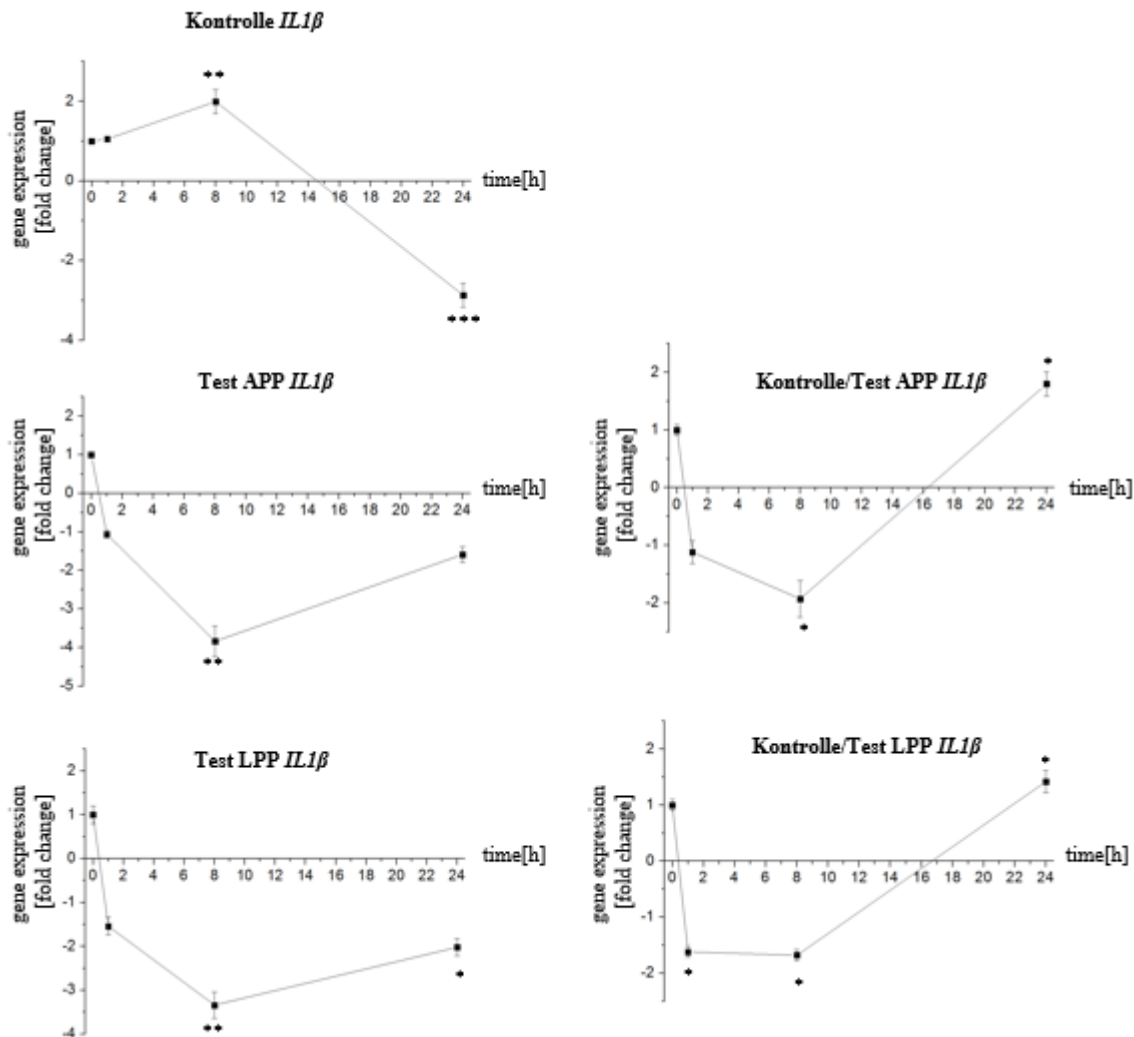


Abbildung 5: Zeitabhängige Immunreaktion der unbehandelten Kontrollimplantate (oben) und der Testimplantate nach Plasmakonditionierung unter Atmosphärendruck (APP, Mitte) und Niederdruck (LPP, unten), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Bei den unbehandelten Kontrollimplantaten zeigte sich nach einer Stunde keine signifikante Änderung der Genexpression ($p \geq 0,05$). Nach 8 Stunden war ein signifikanter Anstieg der Genexpression auf das 2fache im Vergleich zum Zeitpunkt $t=0$ festzustellen ($p \leq 0,01$). Nach 24 Stunden war die Genexpression von IL1 β signifikant niedriger und lag 3,1fach unter dem Ausgangswert ($p \leq 0,001$).

Bei den Implantaten, die unter Atmosphärendruck plasmakonditioniert wurden (Test APP), zeigte IL1 β nach 8 Stunden eine signifikante Abnahme der Genexpression auf ein Niveau, das 4,5fach unter dem Ausgangswert zum Zeitpunkt t=0 lag ($p \leq 0,001$). Nach 24 Stunden war der Wert in Relation zum Zeitpunkt t=0 nicht mehr signifikant verändert und hatte das Expressionsniveau erreicht, das auch nach einer Stunde beobachtet werden konnte (beide $p \geq 0,05$).

Die Genexpression von IL1 β der unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantate zeigte im Verhältnis zu den Ergebnissen der Kontrollimplantate, wie in der Abbildung Kontrolle/Test APP dargestellt, nach 8 Stunden eine signifikante Abnahme ($p \leq 0,05$). Nach 24 Stunden lag die IL1 β -Genexpression 1,7fach über der Expression zum Zeitpunkt t=0 ($p \leq 0,05$).

Die Expression von IL1 β bei den unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantaten (Test LPP) war nach einer Stunde nicht signifikant verändert ($p \geq 0,05$). Nach 8 Stunden war eine 3,5fache Abnahme der Expression erkennbar ($p \leq 0,01$). Nach 24 Stunden wurde ein Anstieg der Genexpression von -3,5fach (8 Stunden) auf -2,1fach ($p \leq 0,05$) beobachtet.

Anschließend wurde der Verlauf der Genexpression von IL1 β der unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantate im Verhältnis zu den Kontrollimplantaten untersucht (Kontrolle Test/LPP). Es zeigte sich, dass die IL1 β -Genexpression nach 1 und 8 Stunden signifikant ($p \leq 0,05$) niedriger war als zum Zeitpunkt t=0. Jedoch wurde nach 24 Stunden eine 1,5fach höhere ($p \leq 0,05$) Genexpression als zum Zeitpunkt t=0 gemessen.

3.2.2 Analyse der Genexpression von $TNF\alpha$

In Abbildung 6 ist die $TNF\alpha$ -Genexpression in humanem Vollblut dargestellt.

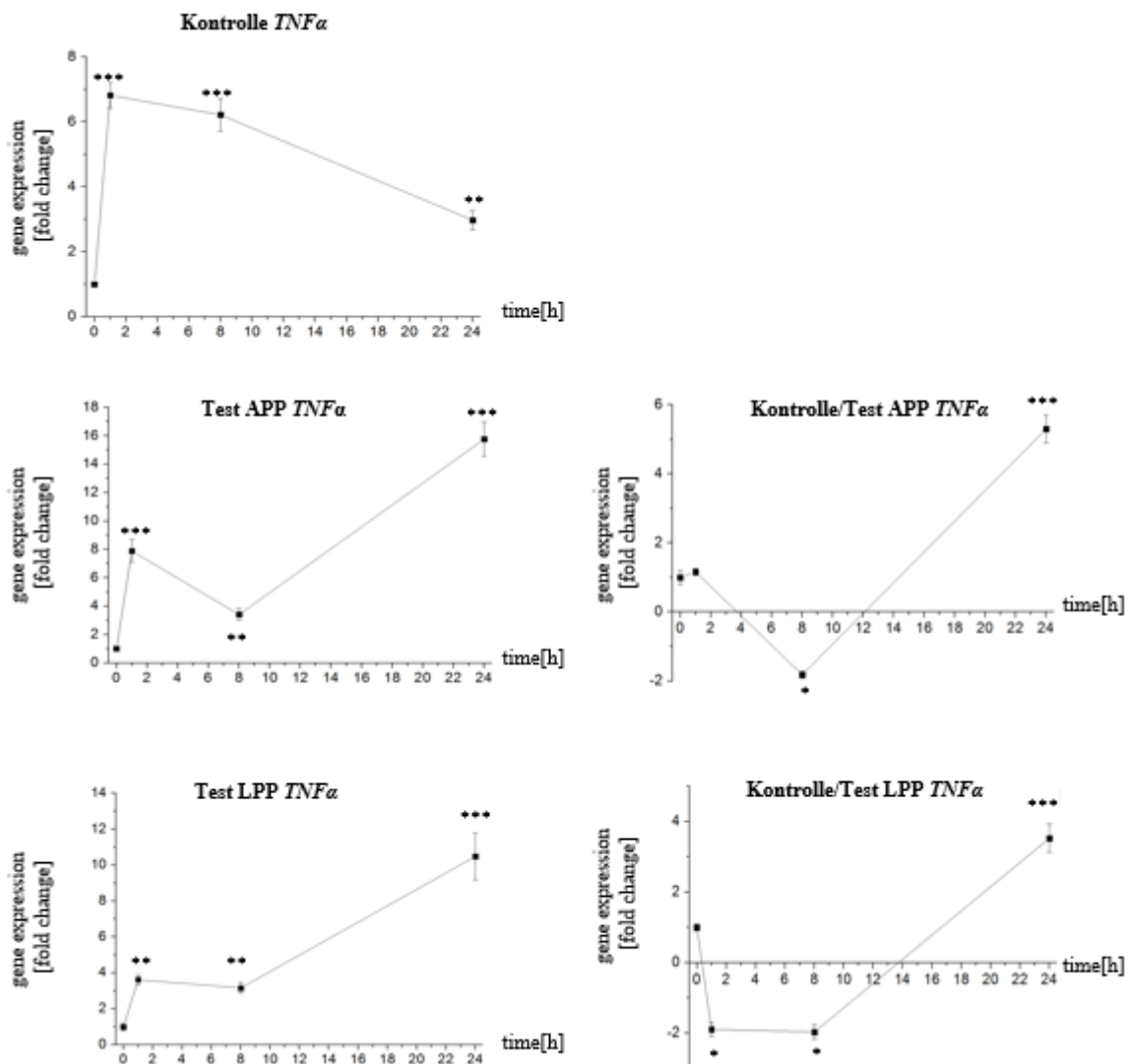


Abbildung 6: Zeitabhängige Immunreaktion der unbehandelten Kontrollimplantate (oben) und der Testimplantate nach Plasmakonditionierung unter Atmosphärendruck (APP, Mitte) und Niederdruck (LPP, unten), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Bei den unbehandelten Kontrollimplantaten zeigte sich nach einer Stunde eine signifikante Zunahme der Genexpression von $TNF\alpha$ ($p \leq 0,001$) um das 6,8fache. Auch nach 8 Stunden war ein signifikanter Anstieg der Genexpression auf das 6,4fache im Vergleich zum Zeitpunkt $t=0$ festzustellen ($p \leq 0,001$). Nach 24 Stunden war die Genexpression von $TNF\alpha$ weiterhin signifikant erhöht und lag 3fach über dem Ausgangswert ($p \leq 0,01$).

Bei den unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantaten (Test APP) zeigte TNF α nach einer Stunde eine signifikante Zunahme der Genexpression auf ein Niveau, das 7,5fach über dem Ausgangswert zum Zeitpunkt t=0 lag ($p \leq 0,001$). Nach 8 Stunden war das Expressionsniveau signifikant um das 3,2fache erhöht ($p \leq 0,01$). Nach 24 Stunden war weiterhin in Relation zum Zeitpunkt t=0 eine signifikante Zunahme um das 15fache zu erkennen ($p \leq 0,001$).

Die Genexpression von TNF α der unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantate zeigte im Verhältnis zu den Ergebnissen der Kontrollimplantate, wie in der Abbildung Kontrolle/Test APP dargestellt, nach 8 Stunden eine signifikante Abnahme ($p \leq 0,05$). Nach 24 Stunden lag die TNF α -Genexpression 5fach über der Expression zum Zeitpunkt t=0 ($p \leq 0,001$).

Die Expression von TNF α bei den unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantaten (Test LPP) war nach einer Stunde signifikant um das 3,8fache erhöht ($p \leq 0,01$). Nach 8 Stunden war ebenfalls eine 3,5fache Zunahme der Expression erkennbar ($p \leq 0,01$). Nach 24 Stunden wurde ein Anstieg der Genexpression um das 10,5fache ($p \leq 0,001$) beobachtet.

Anschließend wurde der Verlauf der Genexpression von TNF α der unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantate im Verhältnis zu den Kontrollimplantaten untersucht (Kontrolle/Test LPP). Es zeigte sich, dass die TNF α -Genexpression nach 1 und 8 Stunden signifikant ($p \leq 0,05$) niedriger war als zum Zeitpunkt t=0. Zudem wurde nach 24 Stunden eine 3,2fach höhere ($p \leq 0,001$) Genexpression als zum Zeitpunkt t=0 gemessen.

3.2.3 Analyse der Genexpression von NFκB

In Abbildung 7 ist die NFκB-Genexpression in humanem Vollblut dargestellt.

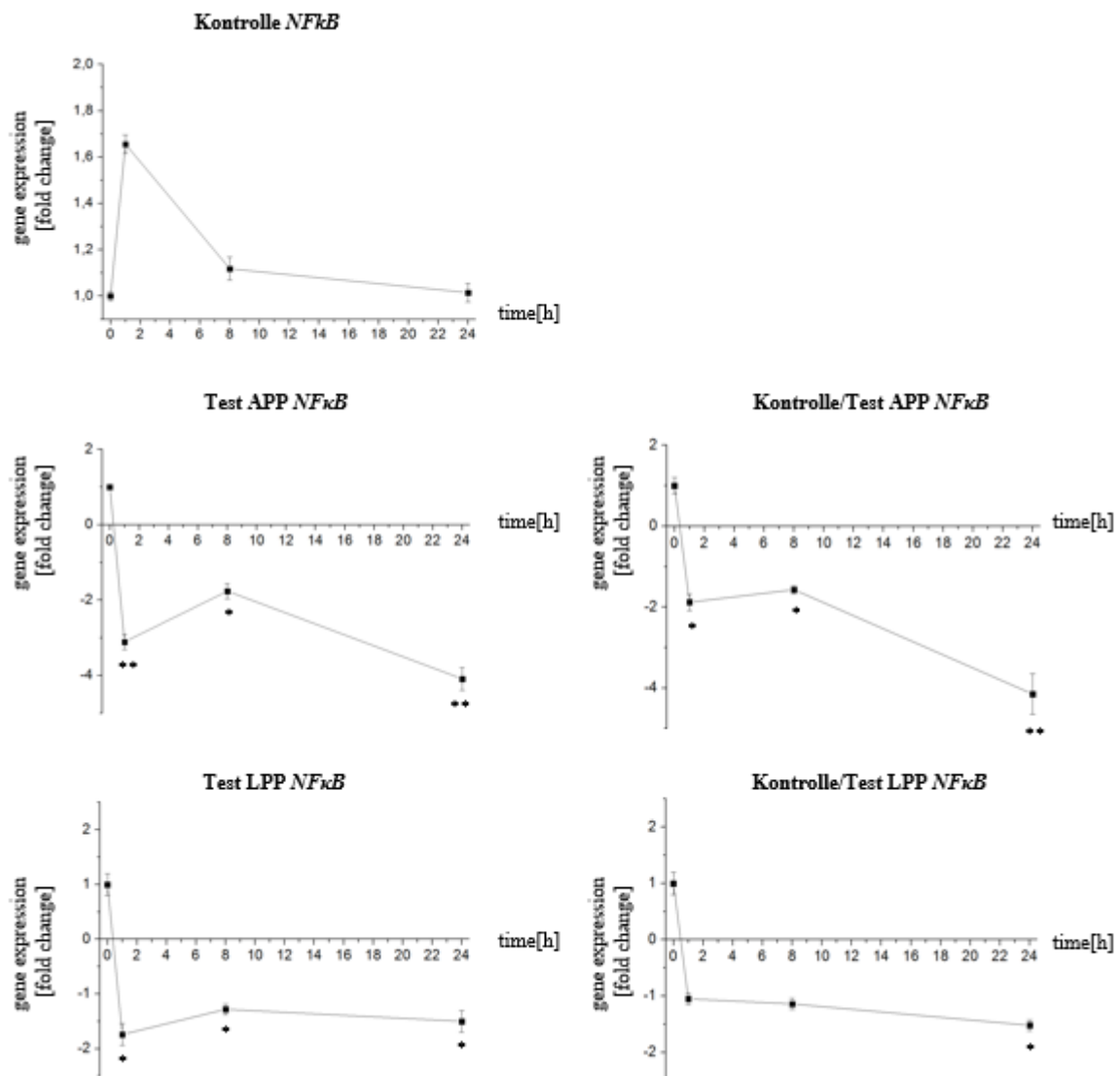


Abbildung 7: Zeitabhängige Immunreaktion der unbehandelten Kontrollimplantate (oben) und der Testimplantate nach Plasmakonditionierung unter Atmosphärendruck (APP, Mitte) und Niederdruck (LPP, unten), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Die Genexpression von NFκB in der Kontrollgruppe zeigte über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikante Änderung ($p \geq 0,05$).

Bei den unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantaten (Test APP) zeigte die Genexpression von NFκB nach einer Stunde einen signifikant um das 2,6fach erniedrigten Wert ($p \leq 0,01$). Nach 8 Stunden war weiterhin eine signifikante Abnahme

der Genexpression auf ein Niveau erkennbar, das 2,3fach unter dem Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ lag ($p \leq 0,05$). Nach 24 Stunden war der Wert in Relation zum Zeitpunkt $t=0$ signifikant verändert und hatte ein Expressionsniveau erreicht, das 3,9fach unter dem Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ lag ($p \leq 0,01$).

Die Genexpression von NF κ B der unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantate zeigte im Verhältnis zu den Kontrollimplantaten, wie in der Abbildung Kontrolle/Test APP dargestellt, nach 1 und 8 Stunden eine signifikante Abnahme ($p \leq 0,05$). Nach 24 Stunden lag die NF κ B-Genexpression 4,2fach unter der Expression zum Zeitpunkt $t=0$ ($p \leq 0,01$).

Die Expression von NF κ B bei den unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantaten (Test LPP) war nach einer Stunde um das 1,7fache signifikant reduziert ($p \leq 0,05$). Nach 8 Stunden war ein Anstieg der Genexpression auf das -1,3fache erkennbar ($p \leq 0,05$). Nach 24 Stunden wurde eine signifikante Abnahme der Genexpression von -1,3fach (8 Stunden) auf das -2,1fache ($p \leq 0,05$) beobachtet.

Anschließend wurde der Verlauf der Genexpression von NF κ B der unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantate im Verhältnis zu den Kontrollimplantaten untersucht (Kontrolle/Test LPP). Es zeigte sich, dass die NF κ B-Genexpression nach 1 und 8 Stunden nicht signifikant ($p \geq 0,05$) verändert war. Jedoch wurde nach 24 Stunden eine 1,5fach niedrigere ($p \leq 0,05$) Genexpression als zum Zeitpunkt $t=0$ gemessen.

3.2.4 Analyse der Genexpression von TLR-4

In Abbildung 8 ist die TLR-4-Genexpression in humanem Vollblut dargestellt.

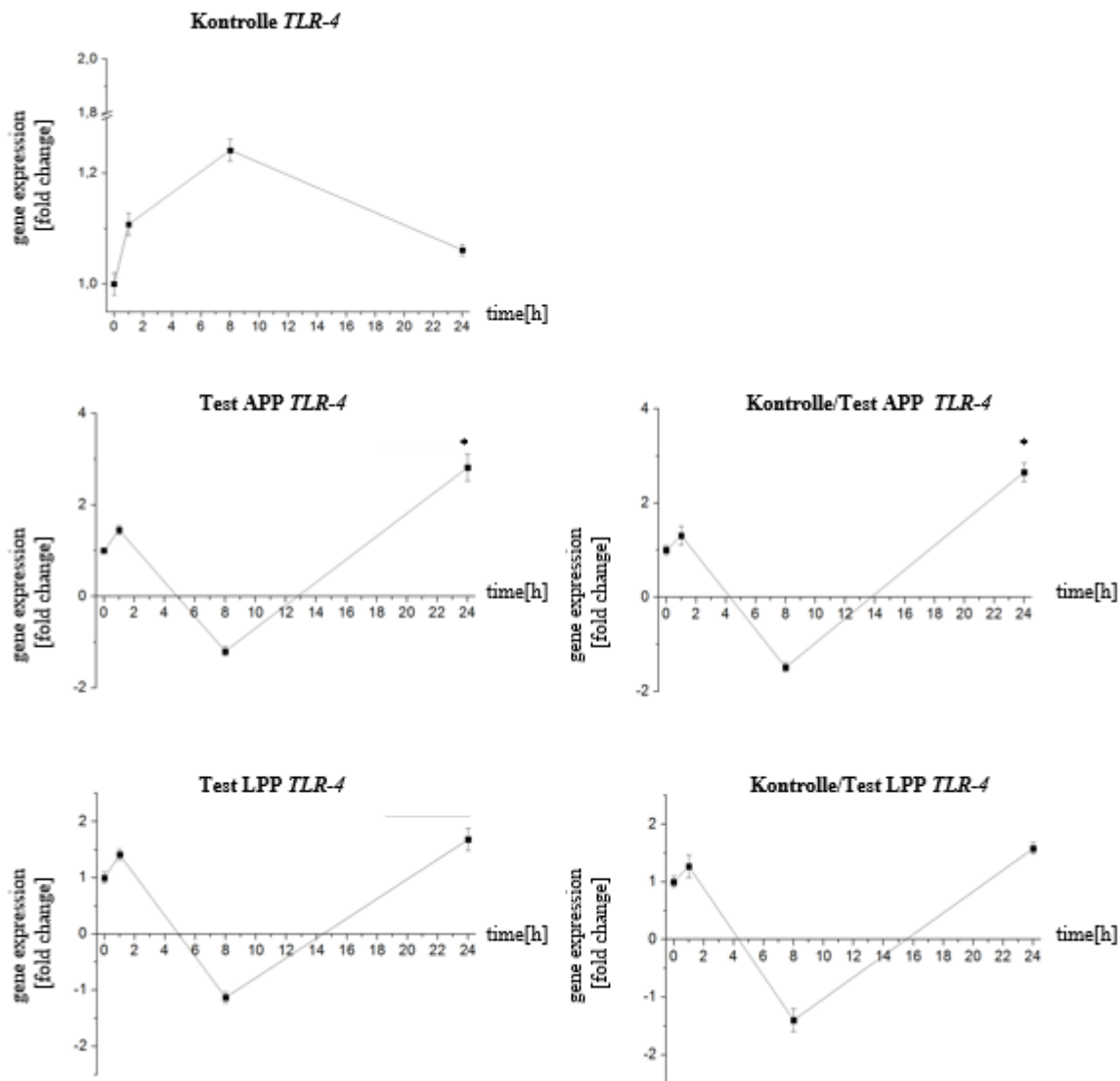


Abbildung 8: Zeitabhängige Immunreaktion der unbehandelten Kontrollimplantate (oben) und der Testimplantate nach Plasmakonditionierung unter Atmosphärendruck (APP, Mitte) und Niederdruck (LPP, unten), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Bei den unbehandelten Kontrollimplantaten zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum keine signifikante Änderung der Genexpression ($p \geq 0,05$).

Die Genexpression von TLR-4 zeigte bei den unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantaten (Test APP) nach 1 und 8 Stunden keine signifikante Veränderung der Genexpression ($p \geq 0,05$). Nach 24 Stunden war der Wert in Relation

zum Zeitpunkt $t=0$ signifikant verändert und hatte ein Expressionsniveau erreicht, das 2,7fach über dem Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ lag ($p \leq 0,05$).

Die Genexpression von TLR-4 der unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantate zeigte im Verhältnis zu den Ergebnissen der Kontrollimplantate, wie in der Abbildung Kontrolle/Test APP dargestellt, nach 1 und 8 Stunden keine signifikante Veränderung ($p \geq 0,05$). Nach 24 Stunden lag die TLR-4-Genexpression 2,5fach über der Expression zum Zeitpunkt $t=0$ ($p \leq 0,05$).

Die Expression von TLR-4 bei den unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantaten (Test LPP) war nach 1, 8 und 24 Stunden nicht signifikant verändert ($p \geq 0,05$).

Anschließend wurde der Verlauf der Genexpression von TLR-4 der unter Niederdruck konditionierten Implantate im Verhältnis zu den Kontrollimplantaten (Kontrolle/Test LPP) untersucht. Es zeigte sich, dass die TLR-4-Genexpression über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht signifikant ($p \geq 0,05$) verändert war.

3.2.5 Analyse der Genexpression von TLR-9

In Abbildung 9 ist die TLR-9-Genexpression in humanem Vollblut dargestellt.

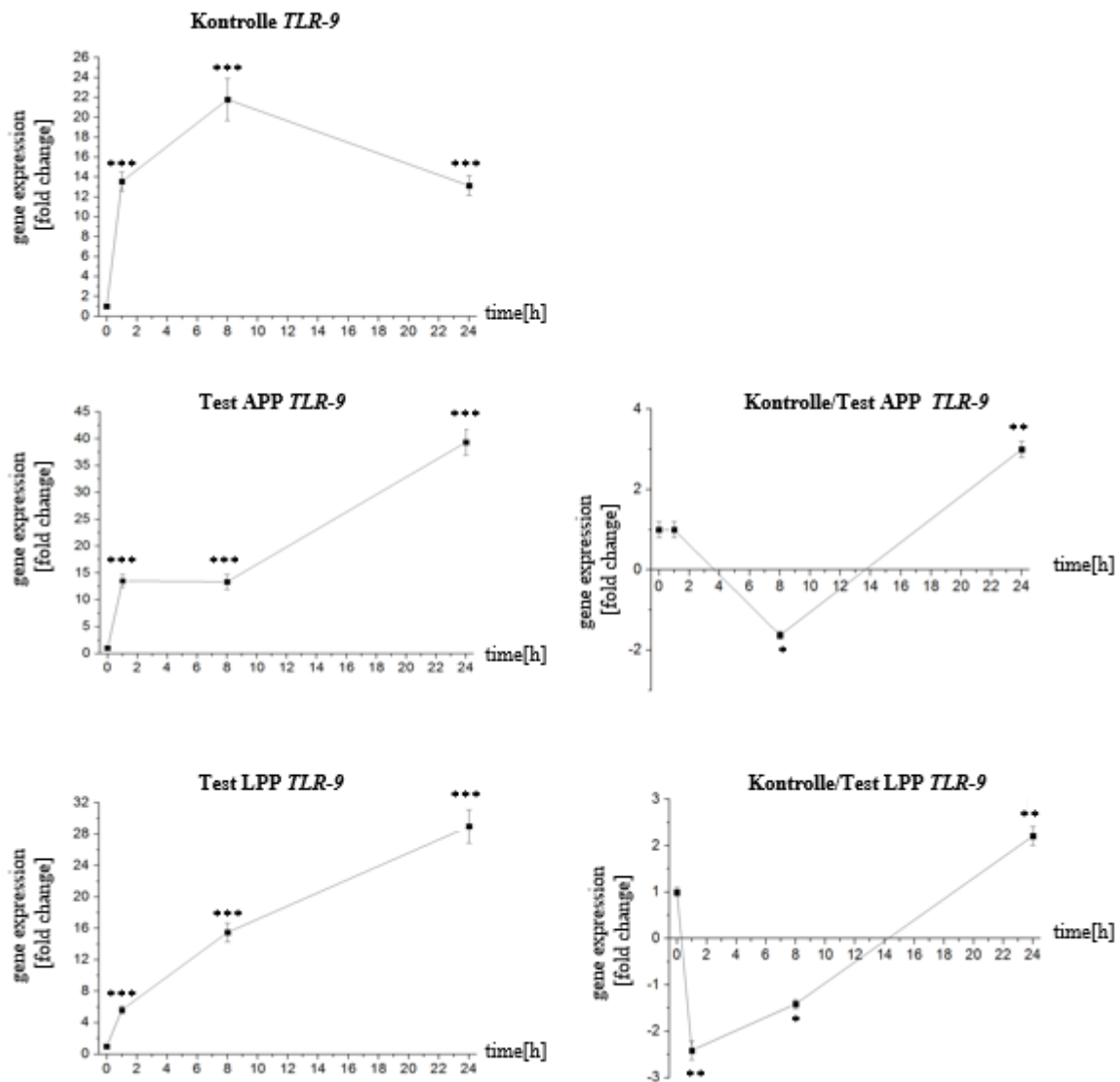


Abbildung 9: Zeitabhängige Immunreaktion der unbehandelten Kontrollimplantate (oben) und der Testimplantate nach Plasmakonditionierung unter Atmosphärendruck (APP, Mitte) und Niederdruck (LPP, unten), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Bei den unbehandelten Kontrollimplantaten zeigte sich nach einer Stunde eine signifikante Zunahme der Genexpression ($p \leq 0,001$) um das 13,2fache. Auch nach 8 Stunden war ein signifikanter Anstieg der Genexpression auf das 21fache im Vergleich zum Zeitpunkt $t=0$ festzustellen ($p \leq 0,001$). Nach 24 Stunden war die Genexpression

von TLR-9 weiterhin signifikant erhöht und lag 13fach über dem Ausgangswert ($p \leq 0,001$).

Bei den unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantaten (Test APP) zeigte TLR-9 nach einer Stunde eine signifikante Zunahme der Genexpression auf ein Niveau, das 13fach über dem Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ lag ($p \leq 0,001$). Nach 8 Stunden war das Expressionsniveau weiterhin auf demselben Niveau wie nach einer Stunde signifikant um das 13fache erhöht ($p \leq 0,001$). Nach 24 Stunden war in Relation zum Zeitpunkt $t=0$ eine signifikante Zunahme um das 39fache zu erkennen ($p \leq 0,001$).

Die Genexpression von TLR-9 der unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantate zeigte im Verhältnis zu den Ergebnissen der Kontrollimplantate, wie in der Abbildung Kontrolle/Test APP dargestellt, nach einer Stunde keine signifikante Veränderung ($p \geq 0,05$) und nach 8 Stunden eine signifikante Abnahme ($p \leq 0,05$). Nach 24 Stunden lag die TLR-9-Genexpression 3fach über der Expression zum Zeitpunkt $t=0$ ($p \leq 0,01$).

Die Expression von TLR-9 war bei den unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantaten (Test LPP) nach einer Stunde signifikant um das 6fache erhöht ($p \leq 0,001$). Nach 8 Stunden war ebenfalls eine 15fache Zunahme der Expression erkennbar ($p \leq 0,001$). Nach 24 Stunden wurde ein Anstieg der Genexpression um das 30fache ($p \leq 0,001$) beobachtet.

Anschließend wurde der Verlauf der Genexpression von TLR-9 der unter Niederdruck konditionierten Implantate im Verhältnis zu den Kontrollimplantaten untersucht (Kontrolle/Test LPP). Es zeigte sich, dass die TLR-9-Genexpression nach 1 Stunde signifikant um das 2,5fache ($p \leq 0,01$) und 8 Stunden signifikant um das 1,5fache ($p \leq 0,05$) niedriger war als zum Zeitpunkt $t=0$. Zudem wurde nach 24 Stunden eine 2,2fach höhere ($p \leq 0,001$) Genexpression als zum Zeitpunkt $t=0$ gemessen.

3.2.6 Analyse der Genexpression von FADD

In Abbildung 10 ist die FADD-Genexpression in humanem Vollblut dargestellt.

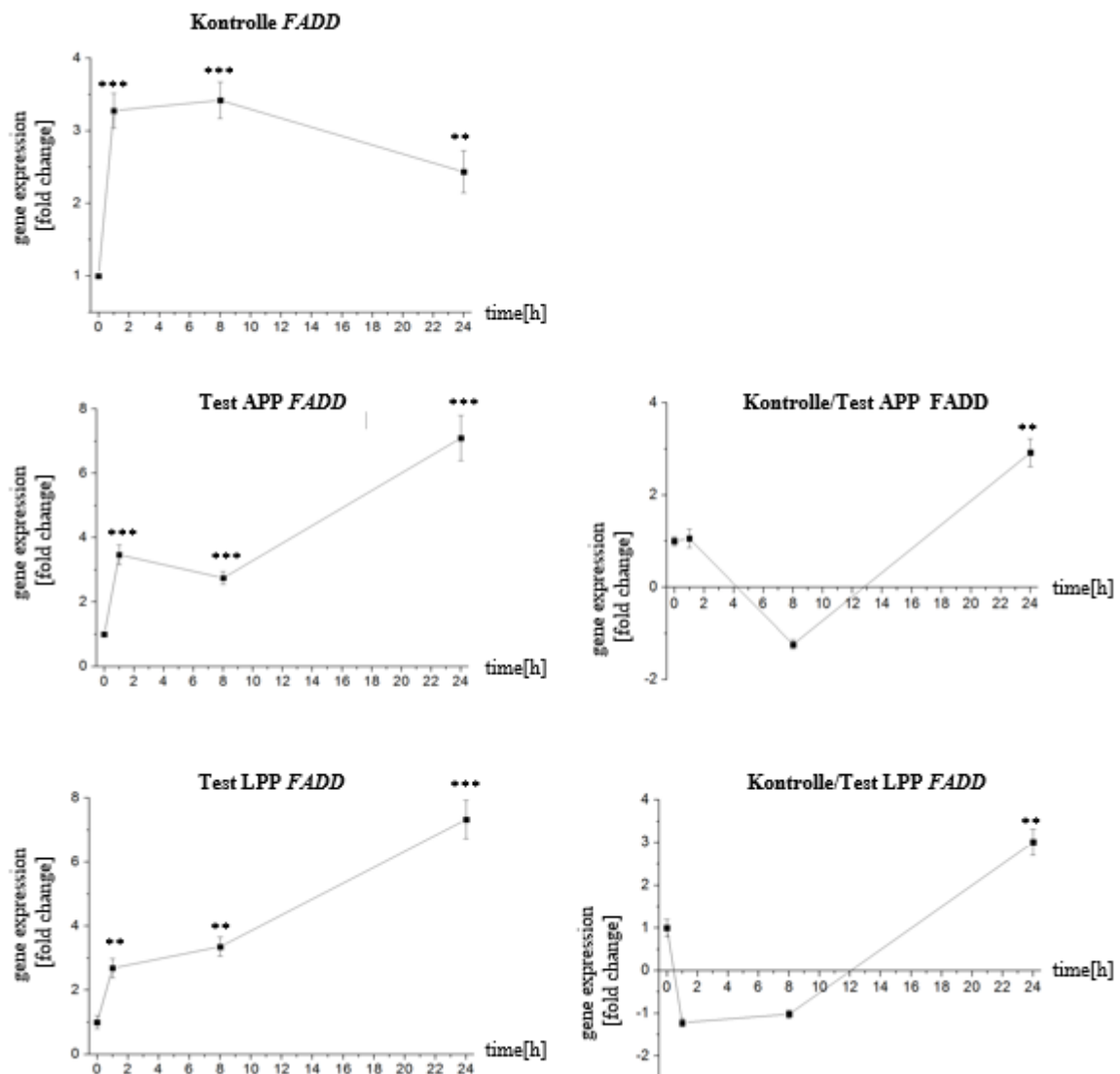


Abbildung 10: Zeitabhängige Immunreaktion der unbehandelten Kontrollimplantate (oben) und der Testimplantate nach Plasmakonditionierung unter Atmosphärendruck (APP, Mitte) und Niederdruck (LPP, unten), * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$.

Bei den unbehandelten Kontrollimplantaten zeigte sich nach einer Stunde eine signifikante Zunahme der Genexpression ($p \leq 0,001$) um das 3,2fache. Auch nach 8 Stunden war ein signifikanter Anstieg der Genexpression auf das 3,3fache im Vergleich zum Zeitpunkt $t=0$ festzustellen ($p \leq 0,001$). Nach 24 Stunden war die

Genexpression von FADD weiterhin signifikant erhöht und lag 2,5fach über dem Ausgangswert ($p \leq 0,01$).

Bei den Implantaten, die unter Atmosphärendruck plasmakonditioniert wurden (Test APP), zeigte FADD nach einer Stunde eine signifikante Zunahme der Genexpression auf ein Niveau, das 3,2fach über dem Ausgangswert zum Zeitpunkt $t=0$ lag ($p \leq 0,001$). Nach 8 Stunden war das Expressionsniveau weiterhin um das 2,8fache erhöht ($p \leq 0,001$). Nach 24 Stunden war in Relation zum Zeitpunkt $t=0$ eine signifikante Zunahme um das 7fache zu erkennen ($p \leq 0,001$).

Die Genexpression von FADD der unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantate zeigte im Verhältnis zu den Ergebnissen der Kontrollimplantate, wie in der Abbildung Kontrolle/Test APP dargestellt, nach 1 und 8 Stunden keine signifikante Veränderung ($p \geq 0,05$). Nach 24 Stunden lag die FADD-Genexpression 3fach über der Expression zum Zeitpunkt $t=0$ ($p \leq 0,01$).

Die Expression von FADD bei den unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantaten (Test LPP) war nach einer Stunde signifikant um das 2,8fache erhöht ($p \leq 0,01$). Nach 8 Stunden war ebenfalls eine 3fache Zunahme der Expression erkennbar ($p \leq 0,01$). Nach 24 Stunden wurde ein Anstieg der Genexpression um das 7,3fache ($p \leq 0,001$) beobachtet.

Anschließend wurde der Verlauf der Genexpression von FADD der unter Niederdruck konditionierten Implantate im Verhältnis zu den Kontrollimplantaten untersucht (Kontrolle/Test LPP). Es zeigte sich, dass die FADD-Genexpression nach 1 und 8 Stunden nicht signifikant verändert war ($p \geq 0,05$) und nach 8 Stunden signifikant um das 1,5fache ($p \leq 0,05$) niedriger war als zum Zeitpunkt $t=0$. Nach 24 Stunden war die Genexpression 2,8fach höher als zum Zeitpunkt $t=0$ ($p \leq 0,01$).

3.3 Übersicht der Ergebnisse

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die APP- und LPP-Behandlung von Titanimplantaten die Expression von IL1 β , TNF α und NF κ B in der Anfangskontaktphase mit humanem Vollblut signifikant reduziert. Eine signifikante Veränderung der Genexpression von TLR-9 und FADD durch die APP- und LPP-Behandlung war in dieser Studie nicht nachweisbar. Es kam sowohl bei den Kontrollimplantaten als auch bei den Testimplantaten zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression.

Die Genexpression von TLR-4 war bei den Implantaten nach Plasmakonditionierung unter Atmosphärendruck nach 24 Stunden erhöht. Bei den Kontrollimplantaten und den unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantaten gab es keine signifikante Veränderung der TLR-4-Genexpression.

Zur besseren Überschaubarkeit und leichteren Vergleichbarkeit der Ergebnisse stellt die nachfolgende Tabelle (Tabelle 2) eine Übersicht über die Zu- und Abnahme der Genexpression der einzelnen Gene über den Beobachtungszeitraum und unter den verschiedenen Versuchsbedingungen dar.

Tabelle 2: Darstellung der Zu- und Abnahme der Genexpression der verschiedenen Gene nach 1, 8 und 24 Stunden.

Die Genexpression der Testimplantate im Verhältnis zu den Kontrollimplantaten ist in der jeweiligen Spalte Test/Kontrolle dargestellt. APP sind die unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantate, LPP die unter Niederdruck plasmakonditionierten Implantate.

↑ Zunahme der Genexpression, ↓ Abnahme der Genexpression

Es wurden nur signifikante Veränderungen eingetragen (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$).

		Kontrolle			Test APP			Test/Kontrolle APP			Test LPP			Test/Kontrolle LPP		
		1h	8h	24h	1h	8h	24h	1h	8h	24h	1h	8h	24h	1h	8h	24h
IL1 β	↑		**							*						*
	↓			***		**			*			**	*	*	*	
TNF α	↑	***	***	**	***	**	***			***	**	**	***			***
	↓								*					*	*	
NF κ B	↑															
	↓				**	*	**	*	*	**	*	*	*			*
TLR-4	↑						*			*						
	↓															
TLR-9	↑	***	***	***	***	***	***			**	***	***	***			**
	↓								*					**	*	
FADD	↑	***	***	**	***	***	***			**	**	**	***			**
	↓															

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik

Die Verwendung von humanem Vollblut als Inkubationsmedium basiert auf einer vorangegangenen Studie, in der gezeigt werden konnte, dass hierdurch eine adäquate Möglichkeit besteht, *in vitro* Zellaktivitäten und Zytokinexpressionen zu analysieren und reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen [58]. Es gibt jedoch einige Einschränkungen im Zusammenhang mit der hier verwendeten Methodik. Da die Immunreaktivität des Blutes nach einiger Zeit ohne Nährstoffzufuhr stagnierte, musste die Beobachtungsdauer in dieser Untersuchung auf 24 Stunden begrenzt werden. Eine Zugabe von Nährstoffen ist bei diesem geschlossenen In-vitro-System nicht möglich. Diese Abschwächung bzw. Abnahme der Genexpression ist jedoch als physiologisch zu bewerten, zumal es sowohl bei den Kontrollgruppen als auch bei den plasmakonditionierten Implantaten zu diesen Prozessen kam [37].

Darüber hinaus konnten in dieser Studie interindividuelle Unterschiede in der Reaktion des Spenderblutes auf die Gerinnung nicht untersucht werden, da nur das Blut eines Spenders verwendet wurde. Da eine Immunreaktion stark individuenabhängig ist, hat dies zur Folge, dass die hier generierten Ergebnisse sehr spezifisch sind [34, 58]. Für weitere Untersuchungen, insbesondere im Hinblick auf das Gerinnungsverhalten, wird es notwendig sein, Blut von mindestens drei verschiedenen Spendern zu verwenden, um spenderspezifische Eigenschaften zu reduzieren.

Im Rahmen einer Entzündung werden Zytokine ausgeschüttet, die untereinander Netzwerke bilden, in denen ein einzelner Faktor selbst mehrere andere induzieren kann, und dieses oft wechselseitig. Daher erscheint es sinnvoll, mithilfe eines Expressionsclusters verschiedene Entzündungsreaktionen zu analysieren und Zytokingruppen zusammenzufassen, die in Kombination spezifische Entzündungsreaktionen oder Erkrankungen hervorrufen [26, 50]. Dies ist im Rahmen der Genexpressionsanalyse spezifischer Gene in dieser Untersuchung erfolgt.

Die Plasmakonditionierung zur Oberflächenmodifikation dentaler Titanimplantate kann eine vielversprechende Möglichkeit darstellen, um eine verbesserte Einheilung der Implantate zu ermöglichen [61]. Hierbei ist es wichtig, ein Verfahren zu wählen, welches in der zahnärztlichen Praxis zukünftig einfach umsetzbar ist. Dies ist vor allem bei der Plasmakonditionierung unter Atmosphärendruck gegeben, da hierbei keine

Veränderung des Luftdruckes erfolgen muss. Dementsprechend ist auch eine Plasmakonditionierung von bereits gesetzten Implantaten intraoral denkbar. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden daher Geräte genutzt, die eine reproduzierbare und konstante Konditionierung ermöglichen. Hierdurch ist eine Vergleichbarkeit mit vorangegangenen und auch nachfolgenden Studien gegeben. Unterstützt wird dies noch dadurch, dass feste Parameter bei der Plasmakonditionierung und eine Standardisierung der Analysevorgänge der Genexpression gewählt wurden.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Einfluss der Plasmakonditionierung auf die Expression von IL1 β und TNF α

Die Wirt-Biomaterial-Beziehung steht im Mittelpunkt aller Reaktionen im Zusammenhang mit der Integration von Implantaten, da das Vorhandensein eines Fremdmaterials (d.h. Implantate) immunologische Reaktionen durch die Aktivierung des Komplementsystems und der Makrophagen stimuliert, von denen erwartet wird, dass sie periimplantäre Ereignisse wie Entzündung, Heilung, Osseointegration und langfristige Wirtsreaktionen kontrollieren [90].

Die erhöhte Expression von IL1 β und TNF α als Reaktion auf Titanoberflächen durch Lymphozyten und Monozyten im menschlichen Blut wurde bereits in früheren Berichten nachgewiesen [66, 88]. Im Hinblick auf die Beobachtungen der aktuellen Studie in Bezug auf die nicht plasmabehandelten Titanoberflächen der Implantate in der Kontrollgruppe scheint es hierbei eine Übereinstimmung zu geben. So wurde jeweils eine signifikante Zunahme der Genexpression von IL1 β und TNF α beobachtet. Jedoch sollte diese Übereinstimmung mit Vorsicht betrachtet werden, da unsere Studie menschliches Vollblut verwendete, das mononukleäre periphere Blutzellen (PBMCs) enthält. Diese PBMCs rufen zwar wahrscheinlich die gleichen Reaktionen hervor wie in der Vergleichsstudie, bei der die Reaktion der isolierten Zelle betrachtet wurde, aber eine humorale Reaktion ist nicht auszuschließen. Um eine starke Entzündungsreaktion zu vermeiden, die sogar zur Abstoßung des Implantates führen kann, sollte ein Gleichgewicht der Immunreaktion geschaffen werden. Entsteht ein Ungleichgewicht bei der Immunantwort auf ein Titanimplantat, ist eine übermäßige Stimulation von Monozyten und Makrophagen die Folge, wodurch es zu einer

Ausschüttung von IL1 β und TNF α als Antwort auf die Titanpartikel kommt. IL1 β und TNF α initiieren als proinflammatorische Zytokine eine Anlagerung von Makrophagen und ihre Differenzierung zu Osteoklasten, wodurch es zu Knochenabbauprozessen kommt. Andererseits konnte gezeigt werden, dass die Entzündungsreaktion durch die verminderte Ausschüttung von IL1 β und TNF α positiv beeinflusst wird und durch eine hydrophile Oberflächenmodifizierung des Titans eine verbesserte Wundheilung und Osseointegration erzielt werden kann [2, 36].

Bei Versuchen an Tieren [39, 76] und Menschen [14] konnte gezeigt werden, dass es in der frühen Phase einer Entzündungsreaktion zu einer vermehrten Genexpression von IL1 β und TNF α kommt. Auch eine In-vitro-Studie, bei der eine menschliche Makrophagen-Zelllinie (THP-1) und das proteomische Profil von Blutplättchen nach Kontakt mit modifizierten Titanoberflächen (poliert, mikraufgeraut, gesandstrahlt, geätzt) untersucht wurden, zeigte eine vermehrte Ausschüttung dieser beiden Proteine [2]. Diese Beobachtung kann durch die jetzige Studie bestätigt werden, bei der es zu einer erhöhten IL1 β - und TNF α -Genexpression in der Gruppe mit den nicht plasmakonditionierten Implantatoberflächen kam.

4.2.2 Einfluss der Plasmakonditionierung auf die Oberfläche dentaler Implantate

Ein Anstieg der FADD-, TLR-4- und TLR-9-medierten Genexpression lässt sich vermutlich durch eine pyrogene Kontamination der dentalen Implantatoberflächen erklären. Zum einen tritt diese gesteigerte Expression sowohl bei den Kontroll- als auch bei den Testimplantaten auf, zum anderen konnte in vorangegangenen Studien eine Kontamination steril verpackter Implantate nachgewiesen werden [37, 74]. Hierbei handelte es sich um Verunreinigungen verschiedener Art, wie zum Beispiel Mikroorganismen, Verpackungsmaterial und mikroskopisch feinen Abrieb, der beim Herstellungsprozess entsteht [27]. Ebenfalls gibt es vergleichbare Beobachtungen in der Chirurgie bei der Verwendung von Aneurysmenclips [58]. Eine Kontamination der Implantate durch die Plasmakonditionierung ist auszuschließen, da es auch bei den nicht plasmakonditionierten Kontrollimplantaten zu einem Anstieg der Genexpression kam.

Die Plasmakonditionierung der dentalen Titanimplantate führt zu einer stark hydrophilen Oberflächenveränderung in Kombination mit anderen physiochemischen

Veränderungen, wie einer ultrafeinen Reinigung und Oberflächenaktivierung, die vergleichbar mit einer Vorbehandlung durch UV-Licht-Bestrahlung sind [21, 40, 61].

Der Aspekt der stark hydrophilen Oberflächenveränderung ist wichtig für die weitere Betrachtung, da dies eine Vergleichbarkeit mit anderen Studien ermöglicht, in denen ebenfalls eine Reduzierung der Genexpression von IL1 β und TNF α nachgewiesen werden konnte. Mehrere Studien haben bereits eine stark hydrophile Titanoberfläche mit einer verminderten Ausschüttung von IL1 β und TNF α in Verbindung gebracht. Hierbei wurden verschiedene Oberflächenmodifizierungen, wie zum Beispiel poliert, mikraufgeraut, gesandstrahlt, geätzt und mit Calciumionen modifiziert, gewählt [2, 7, 35, 36, 39].

Die unterschiedliche Immunreaktion kann eine Osseointegration verbessern, was in zwei Tierversuchen nachgewiesen werden konnte und bereits nach einem kurzen Beobachtungszeitraum von 2 Wochen sichtbar wurde [7, 39].

Eine mögliche Erklärung für die verminderte Ausschüttung von proinflammatorischen Cytokinen auf stark hydrophilen Titanoberflächen könnte die Beziehung zwischen dem Blutkoagel und dem aktivierenden Effekt auf das Komplementsystem sein. Titan fördert die Bildung eines Blutkoagels [10, 42, 89] und die gerinnungsfördernden Eigenschaften tragen zu der guten Osseointegration des Materials bei [42]. Durch die hydrophile Modifizierung der Titanimplantate scheinen diese Eigenschaften noch verbessert zu werden [7, 43]. Bei einer alkalischen Oberflächenmodifizierung von stark hydrophilen Titanoberflächen in humanem Vollblut konnte eine signifikante Reduktion von Makrophagen und Monozyten im Vergleich zu nicht veränderten Titanoberflächen gezeigt werden. Hinzu kamen Unterschiede in der Anordnung von Blutgerinnseln. Auf den unbehandelten Oberflächen waren diese dünn, unvollständig und unstrukturiert ohne große Fibrinnetze. Auf den behandelten stark hydrophilen Titanoberflächen hingegen waren die Blutgerinnsel dick, gut strukturiert und mehrschichtig angeordnet. In dieser Anordnung gab es einen Verbund zwischen den zellkernhaltigen Zellen und eine große Anzahl an Blutplättchen ohne Zellkern, die im Fibringeflecht enthalten war. Hierdurch war eine dichte Bedeckung der gesamten Oberfläche gewährleistet [62].

Es gibt ein Zusammenspiel zwischen der Blutgerinnung und dem Komplementsystem, das besonders in der ersten Phase der Immunantwort wichtig ist. Dennoch ist der genaue Ablauf der Kaskade noch unklar [5, 62, 71].

Die oben beschriebenen Prozesse fanden über einen Zeitraum von mehreren Tagen statt. Der Versuchsaufbau war dementsprechend deutlich länger gewählt, als in der hier dargestellten Arbeit. Es muss deshalb angemerkt werden, dass es im Verlauf der hier beschriebenen Experimente nicht zur Blutkoagulation kam, jedoch ähnliche Änderungen in der frühen Immunantwort (IL1 β - und TNF-Regulierung) beobachtet wurden.

Es ist bekannt, dass das Komplementsystem durch Titan aktiviert wird [8, 48, 54]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass stark hydrophile Titanoberflächen, die mit UV-Licht behandelt wurden, eine weniger starke Aktivierung hervorriefen, was wiederum zu einer verminderten Expression proinflammatorischer Gene im periimplantären Gewebe führte [39].

Die reduzierte Komplementaktivierung wird durch die Oberflächenmodifizierung des Titans hervorgerufen. Hierbei kommt es zu einer Veränderung der chemischen Eigenschaften der äußersten Schicht der Titanoberfläche. Eine vermehrte Oxidierung der Titanoberfläche, die Zunahme von Bindungen von Wasser und Hydroxid, also Zunahme der Hydrophilie, und Kristallinität sind die Folge [54]. Es konnte nachgewiesen werden, dass es durch die Bestrahlung von Titanoberflächen mit kaltem, atmosphärischem Plasma zu einer flächenbezogenen Homogenisierung des Attachments der Zellen kam [78].

Die Verbesserung der Oberflächenbenetzbarkeit durch die Anwendung kalter atmosphärischer Plasmen legt die Schlussfolgerung nahe, dass in Zukunft die Plasmakonditionierung in der Oberflächenkonditionierung von dentalen Titanimplantaten von Bedeutung sein wird [56, 98]. Des Weiteren bietet sich die Möglichkeit, für die Desinfektion und Dekontamination von Oberflächen kalte atmosphärische Plasmen anzuwenden [11, 44, 96].

In welchem Ausmaß die Oberflächenveränderung der Titanimplantate (insbesondere durch die Plasmakonditionierung), die Wirkstoffe (Ionen, Elektronen, reaktiver Sauerstoff und Stickstoff) und das elektrische Feld, das durch das nicht-thermische Plasma entsteht, einen Einfluss auf die hämatologischen und immunologischen Effekte *in vitro*, *in vivo* und klinisch haben, ist noch nicht abschließend geklärt. Dieser Fragestellung sollte in weiteren Studien nachgegangen werden.

4.3 Schlussfolgerung

Soweit bekannt, handelt es sich bei dieser Studie um die erste, die einen Zusammenhang zwischen der Plasmakonditionierung (unter Atmosphären- und Niederdruck) dentaler Implantatoberflächen und der verminderten Expression proinflammatorischer Gene in Kontakt mit humanem Vollblut nachweisen konnte.

Weitere Studien sind nötig, um die exakten Abläufe und Zusammenhänge der Regulierung der Genexpression durch Plasmakonditionierung unter Berücksichtigung des Komplement- und Gerinnungssystems nachzuvollziehen.

Mithilfe der Oberflächenmodifizierung dentaler Implantate durch Plasmakonditionierung scheint es möglich zu sein, die frühe Entzündungsreaktion zu steuern und positiv zu beeinflussen. Die verminderte Ausschüttung von IL1 β und TNF α könnte sich vorteilhaft auf die titaninduzierte Osseointegration auswirken.

Eine Regulierung der körpereigenen Reaktion könnte die Einheilungsprognose, besonders in der frühen Phase des Kontaktes von Blutzellen und Implantat, positiv beeinflussen und zu einer verbesserten Einheilung des Implantates führen. Ebenfalls bestünde die Möglichkeit, im späteren Verlauf eine Periimplantitis zu vermeiden oder zumindest erfolgreich zu therapieren.

5 Zusammenfassung

Bereits vorangegangene Studien konnten zeigen, dass es nach Kontakt von Titanimplantaten mit humanem Vollblut zu einer proinflammatorischen Reaktion kam, die der Reaktion einer durch Lipopolysaccharide verursachten bakteriellen Kontamination ähnelte. In einer weiteren In-Vitro-Studie wurde eine IL-8 vermittelte Entzündungsreaktion als Folge eines Kontaktes von Titanimplantaten und humanem Vollblut gezeigt.

Ziel der vorliegenden Studie war es, einen Nachweis zu erbringen, dass nach Plasmakonditionierung dentaler Titanimplantate mittels LPP und APP eine Veränderung der proinflammatorischen Genexpression in humanem Vollblut auftritt. Zudem sollte untersucht werden, ob durch die Plasmakonditionierung eine positive Beeinflussung der Osseointegration erzielt werden kann.

Die Studie untersuchte die immunologische Antwort von humanem Vollblut auf plasmakonditionierte Titanimplantatoberflächen *in vitro*. Insgesamt wurden 30 dentale Titanimplantate untersucht.

Zur Konditionierung der Titanimplantate wurden 10 Implantate unter Atmosphärendruck mit Stickstoff mittels eines Plasma Jets und 10 Implantate unter Niederdruck mit Argongas in einer Plasmaanlage oberflächenkonditioniert und anschließend in humanem Vollblut inkubiert. Die Konditionierungsdauer im Plasma Jet betrug 1 min und in der Plasmaanlage 15 min. Weitere 10 Implantate dienten als Kontrollgruppe und wurden ohne Plasmakonditionierung in humanem Vollblut in Reaktionsgefäßen inkubiert. Das humane Vollblut stammte von einem 39 Jahre alten, gesunden, männlichen, kaukasischen Spender und wurde mittels Venenpunktion entnommen.

Es wurden Blutproben von den Reaktionsgefäßen, in denen ein jedes Implantat in humanem Vollblut gelagert war, nach 1, 8, und 24 Stunden entnommen und anschließend analysiert. Aus den Blutaliquots wurde RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mithilfe der quantitativen Echtzeit-Polymerasekettenreaktion (qPCR) wurde eine Analyse der Genexpression vorgenommen. Es wurden gezielt Gene analysiert, die an einer proinflammatorischen Reaktion beteiligt sind (IL1 β und TNF α), sowie Gene, die auf eine mögliche Verunreinigung der Implantate hinweisen könnten (FADD, TLR-4 und TLR-9). Die Daten wurden durch den Kolmogorov/Smirnov-Test positiv auf eine Normalverteilung getestet. Hiernach wurden einfaktorielle Varianzanalysen (ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-post-hoc-Test durchgeführt. P-Werte von 0,05 oder kleiner wurden als signifikant betrachtet.

Bei allen Implantaten, den Kontroll- und den Testimplantaten, wurde eine gesteigerte Expression der Gene FADD und TLR-9 beobachtet. Dies ist vermutlich auf eine Kontamination der Implantatoberflächen zurückzuführen.

Sowohl bei den unter Niederdruck als auch bei den unter Atmosphärendruck plasmakonditionierten Implantaten kam es zu einer verminderten Genexpression von IL1 β , TNF α und NF κ B. Dies lässt darauf schließen, dass durch die Oberflächenmodifizierung mittels Plasmakonditionierung, sowohl bei Atmosphären- als auch bei Niederdruck, eine positive Beeinflussung der frühen Phase der

Entzündungsreaktion initiiert werden und sich diese ebenfalls vorteilhaft auf die titaninduzierte Osseointegration auswirken kann.

6 Summary

Previous studies have shown that the proinflammatory reaction caused by titanium implants after contact with human whole blood is similar to gene expression patterns seen after incubating blood samples with lipopolysaccharide (LPS) mimicking a contamination with gram-negative bacteria. Furthermore, in another in vitro study an IL-8 inflammation reaction as direct consequence of contact between titan implants and human whole blood could be demonstrated.

The current in vitro study aimed to analyze the impact of plasma treated titanium implants on proinflammatory gene expression in human whole blood. Furthermore, it was tested whether the positive effects of titanium implants on the osseointegration could be improved by plasma treatment regimes.

The experimental set-up applied here examined an immunologic response of human whole blood in response to plasma treated titanium implant surfaces. Overall 30 dental titanium implants were analyzed. In order to study the impact of conditioning, three groups with ten implants each were conditioned differently: 10 implants were conditioned using nitrogen at atmospheric pressure (treatment time: 1 min), 10 implants were surface conditioned using Argon at low pressure (treatment time: 15 min) and 10 implants were used as controls without any plasma conditioning. The implants were incubated in human whole blood, which was obtained from the vein of a healthy male Caucasian proband.

Blood samples were collected from each implant group after 1, 8 and 24 hours. Before analyzing the gene expression using the quantitative real-time polymerase chain reaction technique (qPCR), ribonucleic acid (RNA) was isolated from the blood and was transcribed into complementary deoxyribonucleic acid (cDNA).

Genes particularly involved in proinflammatory reactions (IL1 β und TNF) as well as genes which may indicate an implant contamination (FADD, TLR-4 und TLR-9) were analyzed. Kolmogorov/Smirnov test for a normal distribution was performed followed

by a single factor variance analysis (ANOVA) and Bonferroni post-hoc testing. Solely p-values less or equal to 0.05 are considered as significant.

All implants of the control as well as the test groups caused increased expression of the genes FADD, TLR-4 and TLR-9, which might result from implant surface contaminations.

In comparison to untreated implants, both the low pressure as well as the atmosphere pressure plasma conditioned implants showed reduced gene expression of IL1 β , TNF α and NF κ B. This might be an indication for a positive impact of the plasma conditioned titanium surface during the early inflammatory stage seen after implant insertion. This positive influence is independent of the conditioning conditions and may have additional positive effects on titanium induced osseointegration.

7 Literaturverzeichnis

1. *Aderem, A., Underhill, D.M.*: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17, 593-623 (1999).
2. *Alfarsi, M.A., Hamlet, S.M., Ivanovski, S.*: Titanium surface hydrophilicity modulates the human macrophage inflammatory cytokine response. *J Biomed Mater Res A* 102, 60-67 (2014).
3. *Albrektsson, T.O., Johansson, C.B., Sennerby, L.*: Biological aspects of implantat dentistry: osseointegration. *Periodontol* 2000 4, 58-73 (1994).
4. *Albrektsson, T., Dahlin, C., Jemt, T.*: Is marginal bone loss around oral implants the result of a provoked foreign body reaction? *Clin Implant Dent Relat Res* 16, 155-165 (2014).
5. *Amara, U., Rittirsch, D., Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J.D., Huber-Lang, M.*: Interaction between the coagulation and complement system. *Adv Exp Med Biol* 632, 71-79 (2008).
6. *Anderson, J.M., Rodriguez, A., Chang D.T.*: Foreign body reaction to biomaterials. *Semin Immunol* 20, 86-100 (2008).
7. *Anitua, E., Prado, R., Orive, G., Tejero, R.*: Effects of calcium-modified titanium implant surfaces on platelet activation, clot formation, and osseointegration. *J Biomed Mater Res A* 103, 969-980 (2015).
8. *Arvidsson, S., Askendal, A., Tengvall, P.*: Blood plasma contact activation on silicon, titanium and aluminium. *Biomater* 28, 1346-1354 (2007).
9. *Bab, I.A., Einhorn, T.A.*: Regulatory role of osteogenic growth polypeptides in bone formation and hemopoiesis. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 3, 31-46 (1993).
10. *Bax, D.V., Kondyurin, A., Waterhouse, A., McKenzie, D.R., Weiss, A.S., Bilek, M.M.M.*: Surface plasma modification and tropoelastin coating of a polyurethane copolymer for enhanced cell attachment and reduced thrombogenicity. *Biomater* 35, 6797-6809 (2014).
11. *Berglundh, T., Lindhe, J., Ericsson, I., Marinello, C.P., Liljenberg, B., Thomsen, P.*: The soft tissue barrier at implants and teeth. *Clin Oral Impl Res* 2, 81-90 (1991).
12. *Beutler, B.*: Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling. *Nature* 430, 257-263 (2004).
13. *Bidez, M.W., Misch, C.E.*: Force transfer in implant dentistry: basic concepts and principles. *J Oral Implantol* 18, 264-274 (1992).

14. *Bielemann, A.M., Marcello-Machado, R.M., Del Bel Cury, A.A., Faot, F.:* Systematic review of wound healing biomarkers in peri-implant crevicular fluid during osseointegration. *Arch Oral Biol* 89, 107-128 (2018).
15. *Blum, C.:* Wirkung von kaltem Atmosphärenplasma auf Titanimplantatoberflächen, *Implantol J* 9, 24-27 (2017).
16. *Bosshardt, D.D., Chappuis, V., Buser, D.:* Osseointegration of titanium, titanium alloy and zirconia dental implants: current knowledge and open questions. *Periodontol* 2000 73, 22-40 (2017).
17. *Boyan, B. D., Lohmann, C. H., Dean, D. D., Sylvia, V. L., Liu, Y., Cochran, D. L., Schwartz, Z.:* Role of implant surface characteristics on bone cell response. *Osteologie*, Supplement 1, Band 8, S.10, 1999.
18. *Brånemark, P.I., Adell, R., Breine, U., Hansson, B.O., Lindstrom, J., Ohlsson, A.:* Intra-osseous anchorage of dental prostheses. I. Experimental studies. *Scand J Plast Reconstr Surg* 3, 81-100 (1969).
19. *Brånemark, P.I., Hansson, B.O., Adell, R., Breine, U., Lindstrom, J., Hallen, O., Ohman, A.:* Osseointegrated implants in the treatment of the edentulous jaw. Experience from a 10-year period. *Scand J Plast Reconstr Surg* 16, 1-132 (1977).
20. *Breitland, S., Opdahl, H., Aspelin, T., Saetre, L., Lyberg, T.:* Blood leukocyte cytokine production after stimulation at different concentrations of glucose and/or insulin. *Acta Anaesthesiol Scand* 53, 183-189 (2009).
21. *Canullo, L., Genova, T., Tallarico, M., Gautier, G., Mussano, F., Botticelli, D.:* Plasma of argon affects the earliest biological response of different implant surfaces: An in vitro comparative study. *J Dent Res* 95, 566-573 (2016).
22. *Clark, R.:* The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair. Springer US, New York 1996.
23. *Cogswell, J.P., Godlevski, M.M., Wisely, G.B., Clay, W.C., Leesnitzer, L.M., Ways, J.P., Gray, J.G.:* NF-kappa B regulates IL-1 beta transcription through a consensus NF-kappa B binding site and a nonconsensus CRE-like site. *J Immunol* 153, 712-723 (1994).
24. *Davis, J.E.:* In vitro modelling of the bone/implant surface. *Anat Rec* 245, 426-445 (1996).
25. *Dirschnabel, A.J., Alvim-Pereira, F., Alvim-Pereira, C.C., Bernardino, J.F., Rosa, E.A. Trevilatto, P.C.:* Analysis of the association of IL1B(C-511T) polymorphism with

dental implant loss and the clusterization phenomenon. Clin Oral Impl Res 22, 1235-1241 (2011).

26. *Dittrich-Breiholz, O., Schneider, H., Wehmeier, L., Resch, K., Kracht, M.*: Entwicklung und Evaluierung eines DNA Mikro Arrays für entzündungsrelevante Gene. Biospektrum 1/03:88-92 (2003).

27. *Duddeck, D.U., Maghaireh, H., Faber, F.J.*: SEM surface analyses of 120 sterile-packed implants. EDI Journal; 11: 64-75 (2015).

28. *Eaton-Bassiri, A., Dillon, S.B., Cunningham, M., Ryczyn, M.A., Mills, J., Sarisky, R.T., Mbow, M.L.*: Toll-like receptor 9 can be expressed at the cell surface of distinct populations of tonsils and human peripheral blood mononuclear cells. Infect Immun 72, 7202-7211 (2004).

29. *Ellingsen, J.E.*: Surface configurations of dental implants. Periodontol 2000 17, 36-46 (1998).

30. *Emmert, S., Brehmer, F., Hänßle, H., Helmke, A., Mertens, N., Ahmed, R., Simon, D., Wandke, D., Maus-Friedrichs, W., Däschlein, G., Schön, M.P., Viöl, W.*: Atmospheric pressure plasma in dermatology: Ulcus treatment and much more. Clin Plasma Med 1, 24-29 (2013).

31. *Franz, S., Rammelt, S., Scharnweber, D., Simon, J.C.*: Immune responses to implants-a review of the implications for the design of immunomodulatory biomaterials. Biomater 32, 6692-6709 (2011).

32. *Gibbard, L.L., Zarb, G.*: A 5-year prospective study of implant-supported single-tooth replacements. J Can Dent Assoc 68, 110-116 (2002).

33. *Goldston, R.J., Rutherford, P.H.*: Plasmaphysik. Eine Einführung. Vieweg, Braunschweig 1998

34. *Gordon, A., Greenfield, E.M., Eastell, R., Kiss-Toth, E., Wilkinson, J.M.*: Individual susceptibility to periprosthetic osteolysis is associated with altered patterns of innate immune gene expression in response to pro-inflammatory stimuli. J Orthop Res 28, 1127-1135 (2010).

35. *Hamlet, S., Alfarsi, M., George R., Ivanovski, S.*: The effect of hydrophilic titanium surface modification on macrophage inflammatory cytokine gene expression. Clin Oral Impl Res 23, 584-590 (2012).

36. *Hamlet, S., Ivanovski, S.*: Inflammatory cytokine response to titanium chemical composition and nanoscale calcium phosphate surface modification. Acta Biomater 7, 2345-2353 (2011).

37. *Harder, S., Quabius, E.S., Ossenkop, L., Mehl, C., Kern, M.*: Surface contamination of dental implants assessed by gene expression analysis in a whole-blood in vitro assay. A preliminary study. *J Clin Periodontol* 39, 987-994 (2012).
38. *Hayashi, R., Ueno, T., Migita, S., Tsutsumi, Y., Doi, H., Ogawa, T., Hanawa, T., Wakabashi, N.*: Hydrocarbon deposition attenuates osteoblast activity on titanium, *J Dent Res.* 93, 698–703 (2014).
39. *Harmankaya, N., Igawa, K., Stenlund, P., Palmquist, A., Tengvall, P.*: Healing of complement activating Ti implants compared with non-activating Ti in rat tibia. *Acta Biomater* 8, 3532-3540 (2012).
40. *Henningsen, A., Smeets, R., Hartjen, P., Heinrich, O., Heuberger, R., Heiland, M., Precht, C., Cacaci, C.*: Photofunctionalization and non-thermal plasma activation of titanium surfaces. *Clin Oral Investig* 22, 1045-1054 (2018).
41. *Holzapfel, B., Wickert, L.*: Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. 2. Auflage. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2007, S. 120-126.
42. *Hong, J., Andersson, J., Ekdahl, K.N., Elgue, G., Axen, N., Larsson, R., Nilsson, B.*: Titanium is a highly thrombogenic biomaterial: possible implications for osteogenesis. *Thromb Haemost* 82, 58-64 (1999).
43. *Hong, J., Kurt, S., Thor, A.*: A hydrophilic dental implant surface exhibits thrombogenic properties in vitro. *Clin Implant Dent Relat Res* 15, 105-112 (2013).
44. *Idlibi, A.N., Al-Marrawi, F., Hannig, M., Lehmann, A., Rueppell, A., Schindler, A., Jentsch, H., Rupf, S.*: Destruction of oral biofilms formed in situ on machined titanium (Ti) surfaces by cold atmospheric plasma. *Biofouling* 29, 369-379 (2013).
45. *Janeway, C.A., Travers, P.*: Immunobiology-The Immune System in Health and Disease. Auflage. In: (Hrsg.): Band 5. Volume, Garland Publishing Inc., London 2001.
46. *Javed, F., Al-Hezaimi, K., Almas, K., Romanos, G.E.*: Is titanium sensitivity associated with allergic reactions in patients with dental implants? A systematic review, *Clin Implant Dent Relat Res* 15(1), 47-52 (2013).
47. *Kaisho, T., Akira, S.*: Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand* 59, 124-130 (2001).
48. *Kanagaraja, S., Lundstrom, I., Nygren, H., Tengvall, P.*: Platelet binding and protein adsorption to titanium and gold after short time exposure to heparinized plasma and whole blood. *Biomater* 17, 2225-2232 (1996).

49. *Kohal, R.J., Wenig, D., Bächle, M., Strub, J.R.*: Loaded custom-made zirconia and titanium implants show similar osseointegration: An animal experiment. *J Periodontol* 75: 1262-1268 (2004).
50. *Kracht, M., Saklatvala, J.*: Transcriptional and post-transcriptional control of gene expression in inflammation. *Cytokine*, 20, 91–106 (2002)
51. *Laine, M.L., Leonhardt, A., Roos-Jansaker, Pena, A.S., van Winkelhoff, A.J., Winkel, E.G., Renvert, S.*: IL-1RN gene polymorphism is associated with peri-implantitis. *Clin Oral Impl Res* 17, 380-385 (2006).
52. *Lautenschlager, E.P., Monaghan, P.*: Titanium and titanium alloys as dental materials. *Int J Dent Res* 43, 245-253 (1993).
53. *Li, H., Lin, X.*: Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation. *Cytokine* 41, 1-8 (2008).
54. *Linderback, P., Harmankaya, N., Askendal, A., Areva, S., Lausmaa, J., Tengvall, P.*: The effect of heat- or ultra violet ozone-treatment of titanium on complement deposition from human blood plasma. *Biomater* 31, 4795-4801 (2010).
55. *Liu, Z.G.*: Molecular mechanism of TNF signaling and beyond. *Cell Res* 15, 24-27 (2005).
56. *Lopez-Heredia, M.A., Legeay, G., Gaillard, C., Layrolle, P.*: Radio frequency plasma treatments on titanium for enhancement of bioactivity. *Acta Biomater* 4, 1953-1962 (2008).
57. *Masuda, T., Yliheikkilä, P.K., Felton, D.A., Cooper, L.F.*: Generalizations regarding the process and phenomenon of osseointegration. Part I. In vivo studies. *Int J Oral Maxillofac Implants* 13, 17-29 (1998).
58. *Mazzotti, F., Beuttler, J., Zeller, R., Fink, U., Schindler, S., Wendel, A., Hartung, T., von Aulock, S.*: In vitro pyrogen test-a new test method for solid medical devices. *J Biomed Mater Res* 80, 276-282 (2007).
59. *Meffert, R.M.*: Endosseous dental implantology from the periodontist's viewpoint. *J Periodontol* 57, 531-536 (1986).
60. *Mellinghoff, J.*: Erste klinische Ergebnisse zu dentalen Schraubenimplantaten aus Zirkonoxid. *Z Zahnärztl Implantol* 22, 288-293 (2006).
61. *Metelmann, H.R., von Woedtke, T., Weltmann, K.D.*: Comprehensive clinical plasma medicine, Springer 2018.

62. *Milleret, V., Tugulu, S., Schlottig, F., Hall, H.*: Alkali treatment of microrough titanium surfaces affects macrophage/monocyte adhesion, platelet activation and architecture of blood clot formation. *Eur Cell Mater* 21, 430-444 (2011).
63. *Montes, C.C., Alvim-Pereira, F., de Castilhos, B.B., Sakurai, M.L., Olandoski, M., Trevilatto, P.C.*: Analysis of the association of IL1B (C+3954T) and IL1RN (intron 2) polymorphisms with dental implant loss in a Brazilian population. *Clin Oral Impl Res* 20, 208-217 (2009).
64. *Moraschini, V., Poubel, L.A., Ferreira, V.F., Barboza Edos, S.*: Evaluation of survival and success rates of dental implants reported in longitudinal studies with a follow-up period of at least 10 years: a systematic review. *Int J Oral Maxillofac Surg* 44, 377-388 (2015).
65. *Morra, M., Cassinelli, C., Bruzzzone, G., Carpi, A., Di Santi, G., Giardino, R., Fini, M.*: Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18, 40-45 (2003).
66. *Moura, C.C., Machado, J.R., Silva, M.V., Rodrigues, D.B., Zanetta-Barbosa, D., Jimbo, R., Tovar, N., Coelho, P.G.*: Evaluation of human polymorphonuclear behavior on textured titanium and calcium-phosphate coated surfaces. *Biomed Mater* 8, (2013).
67. *Nowzari, H., Phamduong, S., Botero, J.E., Villacres, M.C., Rich, S.K.*: The profile of inflammatory cytokines in gingival crevicular fluid around healthy osseointegrated implants. *Clin Implant Dent Relat Res*, 546-552 (2012).
68. *Nowzari, H., Yi, K., Chee, W., Rich, S.K.*: Immunology, microbiology, and virology following placement of NobelPerfect scalloped dental implants: analysis of a case series. *Clin Implant Dent Relat Res* 10, 157-165 (2008).
69. *Nygren, H., Tengvall, P., Lundström, I.*: The initial reactions of TiO₂ with blood, *J Biomed Mater Res* 34, 487-492 (1997).
70. *Oates, T.W., Cochran, D.L.*: Bone cell interactions and regulation by inflammatory mediators. *Curr Opin Periodontol* 3, 34-44 (1996).
71. *Oikonomopoulou, K., Ricklin, D., Ward, P.A., Lambris, J.D.*: Interactions between coagulation and complement-their role in inflammation. *Semin Immunopathol* 34, 151-165 (2012).
72. *Osman, R.B., Swain, M.V.*: A critical review of dental implant materials with an emphasis on titanium versus zirconia, *Mater* 8, 932-958 (2015).

73. Owczarzy, R., Vallone, P.M., Gallo, F.J., Paner, T.M., Lane, M.J., Benight, A.S.: Predicting sequence-dependent melting stability of short duplex DNA oligomers. *Biopolymers* 44, 217-239 (1997).
74. Perala, D.G., Chapman, R.J., Gelfand, J.A., Callahan, M.V., Adams, D.F., Lie, T.: Relative production of IL-1 beta and TNF alpha by mononuclear cells after exposure to dental implants. *J Periodontol* 63, 426-430 (1992).
75. Pjetursson, B.E., Bragger, U., Lang, N.P., Zwahlen, M.: Comparison of survival and complication rates of tooth-supported fixed dental prostheses (FDPs) and implant-supported FDPs and single crowns (SCs), *Clin Oral Impl Res* 18, 97-113 (2007).
76. Preti, G., Martinasso, G., Peirone, B., Navone, R., Manzella, C., Muzio, G., Russo, C., Canuto, R.A., Schierano, G.: Cytokines and growth factors involved in the osseointegration of oral titanium implants positioned using piezoelectric bone surgery versus a drill technique: a pilot study in minipigs. *J Periodontol* 78, 716-722 (2007).
77. Qiagen: QuantiTect SYBR Green PCR Handbook. 1. Auflage. Epoch Biosciences Hilden 2003.
78. Rupf, S., Lange, M., Mayer, C., Hannig, M., Lehmann, A., Schindler, A., Schubert, A., Metzger, W.: Kaltes atmosphärisches Plasma verbessert die Besiedlung von Titan mit primären humanen Osteoblasten. Vortrag, 45. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Grundlagenforschung 2013, online im Internet, URL: http://www.dgzmk.de/fileadmin/user_upload/editors/PDFs/AfG/2012/AfG-Programm-_und_Abstractheft.pdf, zuletzt abgerufen am 18.02.2019.
79. Rutkunas, V., Bukelskiene, V., Sabaliauskas, V., Balciunas, E., Malinauskas, M., Baltriukiene, D.: Assessment of human gingival fibroblast interaction with dental implant abutment materials. *J Mater Sci Mater Med* 26, 169 (2015).
80. Schenk, R.K., Buser, D.: Osseointegration: a reality. *Periodontol* 2000 17, 22-35 (1998).
81. Shimpuku, H., Nosaka, Y., Kawamura, T., Tachi, Y., Shinorhara, M., Ohura, K.: Bone morphogenetic protein-4 gene polymorphism and early marginal bone loss around endosseous implants. *Int J Oral Maxillofac Implants* 18, 500-504 (2003).
82. Shimpuku, H., Nosaka, Y., Kawamura, T., Tachi, Y., Shinorhara, M., Ohura, K.: Genetic polymorphisms of the interleukin-1 gene and early marginal bone loss around endosseous dental implants. *Clin Oral Impl Res* 14, 423-429 (2003).

83. Sicilia, A., Cuesta, S., Coma, G., Arregui, I., Guisasola, C., Ruiz, E., Maestro, A.: Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients. *Clin Oral Impl Res* 19(8), 823-835 (2008).
84. Slotte, C., Lenneras, M., Gothberg, C., Suska, F., Zoric, N., Thomsen, P., Nannmark, U.: Gene expression of inflammation and bone healing in peri-implant crevicular fluid after placement and loading of dental implants. A kinetic clinical pilot study using quantitative real-time PCR. *Clin Implant Dent Relat Res* 14, 723-736 (2012).
85. Strub, J.R., Kern, M., Türp J.C., Witkowski, S., Heydecke, G., Wolfart, S.: Curriculum Prothetik Band III. Kominierte und abnehmbare Prothetik-Implantologie-Nachsorge-Lebensqualität, 4. Auflage. Quintessenz Verlag, Berlin 2011.
86. Tendero, C., Tixier, C., Tristant, P., Desmaison, J., Leprince, P.: Atmospheric pressure plasmas: A review. *Spectrochim Acta B* 61, 2-30 (2005).
87. Textor, M., Sittig, C., Frauchiger, V., Tosatti, S.: Properties and biological significance of natural oxide films on titanium and its alloys. In: Brunette D.M., Tengval, P., Textor, M., Thomsen, P. (Hrsg.): *Titanium in Medicine*. Springer, Berlin 2001, S. 31-35.
88. Thomas, P., Iglhaut, G., Wollenberg, A., Cadosch, D., Summer, B.: Allergy or tolerance: reduced inflammatory cytokine response and concomitant IL-10 production of lymphocytes and monocytes in symptom-free titanium dental implant patients. *Biomed Res Int*, (2013).
89. Thor, A., Rasmusson, L., Wennerberg, A., Thomsen, P., Hirsch, J.M., Nilsson, B., Hong, J.: The role of whole blood in thrombin generation in contact with various titanium surfaces. *Biomater* 28, 966-974 (2007).
90. Trindade, R., Albrektsson, T., Galli, S., Prgomet, Z., Tengvall, P., Wennerberg, A.: Osseointegration and foreign body reaction: Titanium implants activate the immune system and suppress bone resorption during the first 4 weeks after implantation. *Clin Implant Dent Relat Res* 20, 82-91 (2018).
91. Tschernitschek, H., Borchers, L., Geurtsen, W.: Nonalloyed titanium as a bioinert metal-a review. *Quintessence Int* 36, 523-530 (2005).
92. Urbanski, W., Marycz, K., Krzak, J., Pezowicz, C., Dragan, S.F.: Cytokine induction of sol-gel-derived TiO₂ and SiO₂ coatings on metallic substrates after implantation to rat femur. *Int J Nanomed* 12, 1639-1645 (2017).

93. Weltmann, K.-D., Brandenburg, R., von Woedtke, T., Ehlbeck, J., Foest, R., Stieber, M., Kindel, E.: Antimicrobial treatment of heat sensitive products by miniaturized Atmospheric Pressure PlasmaJets (APPJs). *J Phys D: Appl Phys* 41, 1-5 (2008).
94. Wennerberg, A., Hallgren, C., Johansson, C., Danelli, S.: A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses. *Clin Oral Impl Res* 9, 11-19 (1998).
95. Williams, D.F.: On the mechanisms of biocompatibility. *Biomater* 29, 2941-2953 (2008).
96. Wind, D., Rupf, S., Schäfer, B., Hannig, M., Lehmann, A., Hofmann, T., Schindler, A.: Treatment of ex vivo biofilms by non-thermal atmospheric plasma jet. *Caries Res*, 179–244 (2009).
97. Wu, D.Y., Ugozzoli, L., Pal, B.K., Qian, J., Wallace, R.B.: The effect of temperature and oligonucleotide primer length on the specificity and efficiency of amplification by the polymerase chain reaction. *DNA Cell Biol* 10, 233-238 (1991).
98. Yoshinari, M., Wei, J., Matsuzaka, K., Inoue, T.: Effect of cold plasma-surface modification on surface wettability and initial cell attachment. *World Acad Sci Eng Technol* 3, 171-175 (2009).

Anhang

8 Danksagung

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Prof. Dr. M. Kern, Direktor der Klinik für Zahnärztliche Prothetik, Propädeutik und Werkstoffkunde, UKSH, Campus Kiel, für die Bereitstellung des Themas und die Unterstützung in der Anfertigung der Arbeit.

Herrn PD Dr. S. Harder möchte ich für die Unterstützung bei der Beschaffung von Fördergeldern, die Einführung in das Thema, die Unterstützung bei der Verfassung der Arbeit und der Veröffentlichung der generierten Daten danken.

Frau Dr. E. S. Quabius danke ich herzlich für die unermüdliche Unterstützung und ihre freundliche Motivation bei der Vollendung der Arbeit.

Frau Hilke Clasen möchte ich für die Unterstützung und die Einführung in die molekularbiologischen Techniken, insbesondere der RNA-Extraktion und den anschließenden qPCRs, danken.

Mein Dank gilt ebenfalls Herrn Prof. Dr. H. Kersten für die freundliche Aufnahme im Institut für Physik, in dessen Laborräumen der praktische Teil der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Ebenfalls danke ich Dr. T. Kewitz und Herrn L. Hansen für die tatkräftige Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Ebenso gilt mein Dank der DGI, die durch ihre großzügige finanzielle Unterstützung diese Arbeit ermöglicht hat. Ebenfalls danke ich der Firma Camlog für die Bereitstellung der dentalen Titanimplantate zur Durchführung der Versuche.

Auch danke ich noch zahlreichen weiteren Personen, die hier keine namentliche Erwähnung fanden, aber trotzdem zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mich immerwährend unterstützt und gestärkt haben.

9 Veröffentlichungen

Becker, M., Quabius, S., Kewitz, T., Hansen, L., Becker, G., Kern, M., Kersten, H., Harder, S.: In vitro study of changes in proinflammatory gene expression in human whole blood after contact with plasma-treated implant surfaces, J Craniomaxillofac Surg 47, 1255-1261 (2019).

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig, abgesehen von der Beratung durch meine akademischen Betreuer, und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den benutzten Werken wörtlich und inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.